



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**CARACTERIZACIÓN DE UNA REGIÓN
HINDIII DE 3KB (H₂) DEL GENOMA DE
LEISHMANIA (VIANNIA) PORTADORA DE
GENES DE LA BETA TUBULINA**

Dirigido por:

Dr. Alexis Mendoza-León

Trabajo Especial de Grado Presentado ante
la Ilustre Universidad Central de Venezuela
por el Br. Ruben Salvador Biomon Veitia,
para optar al título de Licenciado en
Biología

Caracas, Venezuela

Septiembre, 2010

DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DEL BR. RUBEN SALVADOR BIOMON VEITIA

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de facultad de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de el Br. Ruben Salvador Biomon Veitia, titulado: **Caracterización de una región HindIII de 3 Kb del genoma de *Leishmania (Viannia)* portadora de genes de la beta tubulina**, para optar al título de licenciado en Biología considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **aprobado**.

Para dar fe de ello, se levanta la siguiente acta en Caracas, a los 10 días del mes de Septiembre del dos mil diez, dejando constar que el Dr. Alexis Mendoza-León actuó como Tutor de dicho trabajo.

Dr. Alexis Mendoza-León (Tutor) _____

Dra. Fracehuli Dagger _____

Dr. Hernán Carrasco _____

DEDICATORIA

A mis abuelos y a Zula; sin su apoyo nunca hubiese llegado tan lejos

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a los cielos por dejarme llegar hasta aquí, quien quiera que sea que este allá arriba muchas gracias. A mi familia: mis abuelos, Zula, Manuel, el Negro, Salvi; sin su ayuda dudo que hubiese pasado del primer semestre. Mi tutor Alexis gracias por soportarme, se que no se la puse fácil. A mis amigos Lucelia, Ana, Andrea, María de los Ángeles, Cristo, Joshi, Sonia, Florit, Nelson, Karen, Belize, Txomin...son muchos como para ponerlos todos pero igual gracias por estar conmigo en los buenos momentos y soportarme en los malos. A mi pana Gabriel por ayudarme a poner las cosas realmente en perspectiva, sin eso estaría aun flotando por el universo. A Johan por ayudarme en las últimas semanas de locura. Al Samuel Robinson por darme la oportunidad de entrar en la UCV le estaré eternamente agradecido. A todos los profesores que tuve a lo largo de la carrera, les agradezco por intentar darme algo de su conocimiento. A Physis por ser mi casa lejos de casa; a la facultad de Ciencias, mi facultad de la cual me siento muy orgulloso de ser parte gracias por mantenerme todos estos años y finalmente a la Ilustre Universidad Central de Venezuela, la casa que vence las sombras solo puedo decirle gracias por prepararme tanto académica como personalmente para ser un profesional competente.

RESUMEN

La Leishmaniasis es un padecimiento que provoca una amplia gama de patologías en el humano y en términos epidemiológicos esta enfermedad exhibe grandes variaciones a lo largo del continente Americano, lo que ha originado incertidumbre en la correlación especie-clínica. Por tal razón se han desarrollado numerosas herramientas para el diagnóstico e identificación del parásito a diferentes niveles. En los últimos años técnicas basadas en marcadores genotípicos tales como el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han mostrado una mayor especificidad y sensibilidad en comparación con las metodologías tradicionales.

En un análisis de RFLP sobre la región de los genes de β -tubulina en el DNA genómico de *Leishmania* se encontraron diferencias entre los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*; por ej. en *L. (Viannia) guyanensis* se encontraron dos fragmentos *HindIII* de tamaño 2.4 kb y 3 kb, denominados H₁ y H₂ respectivamente, mientras que para *L. (Leishmania) mexicana* se encontró solo un fragmento *HindIII* de 3.4 kb (H₃).

En este proyecto se prosiguió el análisis de la región H₂ de *L. (V.) guyanensis*, luego de clonarse la misma en el plásmido pUC18. Varios intentos en la purificación del recombinante para completar la caracterización fueron infructuosos por razones técnicas. Paralelamente se realizó un análisis *in silico* de los genes de β -tubulina de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) infantum* y *Trypanosoma brucei* utilizando la aplicación *nucleotide* BLAST. Los resultados de este procedimiento apoyan lo obtenido experimentalmente sobre los loci de β -tubulina y las regiones *HindIII* (Mendoza-León y col, 1995) pero difieren con lo reportado por otros autores.

ÍNDICE GENERAL

Veredicto	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Resumen	iv
Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	ix
Financiamiento	x
1.- Introducción	1
1.1.- La Leishmaniasis	1
1.2.-Clasificación y ciclo de vida	3
1.3- Organización genómica	6
1.4.-Diagnóstico e identificación	7
2.- Antecedentes	13
2.1- Estudio de los genes de β -tubulina	13
2.2.- Identificación de marcadores moleculares	15
2.3.- Planteamiento del problema y Justificación	18
3.- Objetivos	23
3.1.- Objetivo General	23

3.2.- Objetivos específicos-----	23
Capitulo II-----	24
4.1.- Materiales-----	24
4.2.- Metodologías -----	27
4.2.1.- Digestión de Aislados previos de DNA genómico de cepas de <i>Leishmania</i> con la enzima <i>HindIII</i> -----	27
4.2.2.- Electroforesis -----	27
4.2.3.- Extracción del DNA a partir de un gel de agarosa -----	28
4.3- Clonamiento-----	29
4.3.1- Formación de la molécula de DNA recombinante -----	29
4.2.5.- Preparación de células competentes y transformación-----	29
4.2.6.- Selección de recombinantes-----	30
4.2.7.- Cultivo de bacterias portadoras de plásmidos recombinantes con DNA genómico de <i>Leishmania (Viannia)</i> . -----	31
4.2.8.- Aislamiento de DNA extracromosómico a partir de células de <i>E. coli</i> y Amplificación mediante la técnica de PCR de la secuencia de β -tubulina -----	33
4.2.10 Análisis <i>in silico</i> -----	34
Capitulo III-----	36
5.-Resultados -----	36
5.1.-Evaluación de recombinantes de <i>E. coli</i> que contienen la región H ₂ -----	36

5.2.- Construcción de una librería que contiene la región H ₂	38
5.3.- Análisis <i>In silico</i> de regiones <i>HIND</i> III que contienen genes de β -tubulina	42
Capitulo IV	50
6.- Discusión de Resultados	50
7.- Conclusiones.....	56
8.- Recomendaciones.....	57
Capitulo V	58
9.- Bibliografía	58
10.- Referencias en Internet	65
11.- Anexos	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Clasificación de las distintas especies del genero <i>Leishmania</i>	4
Figura 2.- Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	5
Figura 3.- Regiones de β -tubulina en <i>Leishmania sp.</i>	16
Figura 4.- A: Especificidad de la región β 500. B: Región de β -tubulina en <i>L. (V.) guyanensis</i> . C: Esquema de la organización de las secuencias asociadas a β -tubulina en las regiones H ₁ y H ₂	19
Figura 5.- A: Vector pUC19. B Vector pUC19 recombinante/organización hipotética de la region H ₂	26
Figura 6.- Esquema representativo de la selección y evaluación de clones	32
Figura 7.- A: Amplificación de β -tubulina a partir de un pool de clones de la librería original de la región H ₂ de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . B y C: Amplificación de β -tubulina a partir de un pool de clones individuales que contienen en la región H ₂	37
Figura 8.- Evaluación de la integridad del DNA genómico de varias especies de <i>Leishmania sp.</i>	38
Figura 9.- Electroforesis productos de PCR Tub ₁ /Tub ₆ del DNAg de varias cepas de <i>Leishmania (Viannia)</i>	39
Figura 10.- Digestión con la enzima de restricción λ -HindIII.	40
Figura 11.- A: Electroforesis de las regiones H ₁ y H ₂ purificadas. B: Electroforesis de la amplificación Tub ₁ /Tub ₆	41
Figura 12.- Organización del gen de β -tubulina en el cromosoma 1 de <i>Trypanosoma brucei</i> . 43	
Figura 13.- Organización del gen de β -tubulina en el cromosoma 8 de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> y <i>Leishmania (Leishmania) major</i>	44
Figura 14.- Organización del gen de β -tubulina en el cromosoma 21 de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> y <i>Leishmania (Leishmania) major</i>	45
Figura 15.- Organización del gen de β -tubulina en el cromosoma 33 de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> y <i>Leishmania (Leishmania) major</i>	46
Figura 16.- Organización del gen de β -tubulina en el cromosoma 21 de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	47
Figura 17.- Organización del gen de β -tubulina en el cromosoma 33 de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Principales especies causantes de la leishmaniasis humana (Modificado de Bari y Rahman, 2008).....	2
Tabla 2.- Marcadores moleculares utilizados en la identificación del género <i>Leishmania</i>	12
Tabla 3.- Designación y origen de las cepas según la Organización Mundial de la Salud (OMS).....	25
Tabla 4.- Condiciones del ensayo de ligamiento	30
Tabla 5.- Volúmenes utilizados para el ensayo de PCR	34
Tabla 6- Características de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de la región de β -tubulina (Modificado de Cuervo, 2008).....	35
Tabla 7.- Componentes de la MASTER MIX (Promega).....	35
Tabla 8.- Resumen de los fragmentos HindIII encontrados en <i>Leishmania sp.</i>	50
Tabla 9.- Combinaciones de oligonucleótidos propuesta para la caracterización de la región H ₂	58

FINANCIAMIENTO

El Trabajo Especial de Grado (TEG) se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos ubicado en el Instituto de Biología Experimental (IBE) a cargo del Profesor Alexis Mendoza-León dentro de los proyectos CDCH N° A 03.00.6991.2007 y PG 03.00.7000.2007.

CAPÍTULO I

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- LA LEISHMANIASIS

Leishmaniasis es el nombre dado al colectivo de afecciones causadas por organismos del genero *Leishmania* (Castilho y col., 2003). La amplia gama de formas que puede adoptar esta enfermedad en el ser humano depende, entre otras cosas, de la especie que cause la infección, la respuesta inmune del hospedador y factores genéticos del hospedador. Las variantes de la enfermedad se pueden clasificar en dos grandes presentaciones clínicas básicas: la leishmaniasis cutánea (LC) que incluye las variantes cutánea localizada (LCL), cutánea difusa (LCD) y mucocutánea (LMC) caracterizadas por la aparición de nódulos o úlceras definidas, acompañadas en ciertos casos de la destrucción de las principales mucosas (nariz, boca, faringe); la segunda la leishmaniasis visceral o (LV) Kala-Azar, que afecta principalmente los órganos filtradores como el hígado y el bazo. En la tabla 1 se señalan las principales especies causantes de la leishmaniasis humana.

A nivel mundial la leishmaniasis se mantiene como un problema de salud pública en 88 países de las regiones tropicales y subtropicales de cuatro continentes, abarcando desde la cuenca del mediterráneo hasta el sureste de Asia, América Central y América del sur. Para el 2007 se contaba con un estimado de prevalencia de 12 millones de personas y cada año aproximadamente se registran dos millones de casos nuevos en todo el mundo, correspondiendo un millón

quinientos mil a leishmaniasis cutánea (Informe WHO, 2007), si bien por diversas razones se cree que estos valores subestiman el número real de casos. Hoy en día la enfermedad tiene una distribución geográfica más extensa que en años anteriores y continuamente se reciben reportes de pacientes infectados en áreas que previamente se consideraban como no endémicas (Informe WHO, 2007).

Tabla 1.- Principales especies causantes de la leishmaniasis humana (Modificado de Bari y Rahman, 2008)

Especie	Padecimiento	Ubicación geográfica
<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	Visceral (Kala-Azar)	Sudan, África del este
<i>Leishmania (L.) infantum</i>	Visceral infantil	Sudan, África del este
<i>Leishmania (L.) major</i>	Cutánea	Región mediterránea, Medio oriente, África del norte,
<i>Leishmania (L.) tropica</i>	Cutánea	Región mediterránea, Medio oriente, África del norte,
<i>Leishmania (L.) mexicana</i>	Cutánea	México, Honduras, Guatemala, Cuenca del Amazonas y Venezuela
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	Cutánea	Brasil, Venezuela, Colombia, Perú
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	Mucocutánea	Brasil, Venezuela, Colombia, Perú

En las Américas se han reportado casos desde el norte de Argentina hasta el sur de Texas con la excepción de Chile y Uruguay; de acuerdo a los datos del Programa Regional en el 2006 se registraron aproximadamente 62.000 casos de LC siendo los países más afectados Brasil, Colombia, Paraguay, Venezuela,

Panamá, Ecuador y Perú. En cuanto a la LV, se reportaron más de 5.000 casos y el país más afectado es Brasil (Informe WHO 2007) y en el periodo 1970-2007 se ha observado un incremento continuo en Venezuela, específicamente en los valles del sistema montañoso de la Costa, la depresión de Yaracuy, algunas secciones de los Llanos y de los Andes, el sur del Orinoco, la zona montañosa y boscosa de Táchira, Mérida, Trujillo, Lara, Miranda y Sucre, además de los estados Carabobo y Aragua (Nieves & col., 2007) siendo las manifestaciones más frecuentes la LC y la LMC. La leishmaniasis visceral es menos frecuente en Venezuela; sin embargo, se han diagnosticado un foco central en los estados Guárico-Carabobo-Cojedes-Aragua, un foco occidental entre los estados Portuguesa-Lara-Trujillo, y un foco oriental en los estados Sucre y Anzoátegui (Torrealba, 2008).

1.2.-CLASIFICACIÓN Y CICLO DE VIDA

Los organismos agrupados dentro del género *Leishmania* pertenecen al Subreino Protozoa, Phylum Sarcomastigophora, Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae; esta familia incluye no solo a *Leishmania* sino también al género *Trypanosoma*, causantes de un amplio espectro de patologías humanas (Mendoza-León y col., 1996).

Actualmente se acepta la división taxonómica propuesta por Lainson y Shaw (1987) fundamentada en el comportamiento del parásito en el tracto digestivo de un insecto vector. Los parásitos que se desarrollen en la región Suprpylaria (región media y posterior) pertenecen al subgénero *Leishmania*

(*Leishmania*), mientras que aquellos restringidos a la región Peripylaria (región anterior) se incluyen en el subgénero *Leishmania* (*Viannia*) (Figura 1).

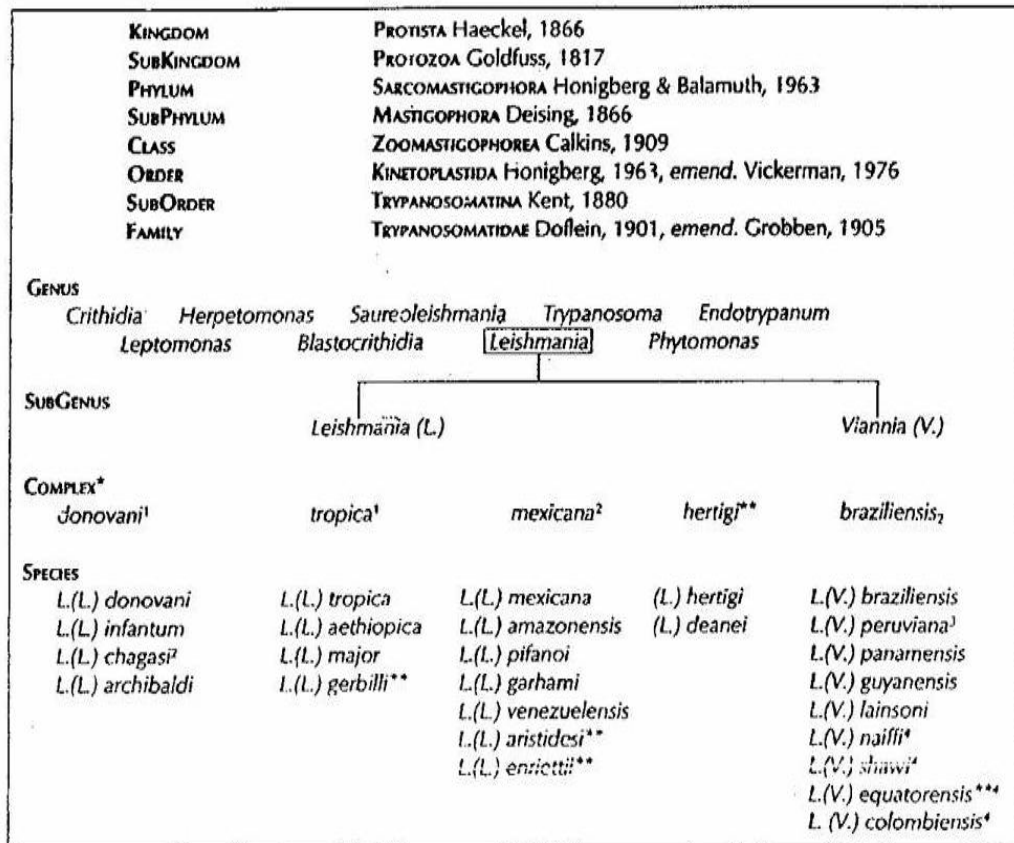


Figura 1.- Clasificación de las distintas especies del género *Leishmania*. (Tomado de Mendoza-León y col, 1996)

Estos organismos presentan un ciclo de vida heteroxénico en el cual intervienen un hospedador vertebrado y un vector representados por insectos flebótomos pertenecientes al Orden Diptera, Familia Phlebotominae géneros *Phlebotomus* para el Viejo Mundo y *Lutzomyia* para el Nuevo Mundo (Mendoza-León y col, 1996).

En el hospedador vertebrado se encuentran las formas amastigotes parasitando los macrófagos dentro del fagolisosoma, donde estos se dividen por

fisión binaria repetidas veces hasta que finalmente la célula hospedadora se rompe, liberando nuevos amastigotes que pueden colonizar otros macrófagos. Cuando un amastigote es ingerido por un flebótomo este migra hacia la región Suprapylaria o Peripylaria elongándose, desarrollando rápidamente el flagelo y transformándose en un promastigote, dividiéndose en el lumen del intestino por fisión binaria (Zuckerman y Lainson, 1995). Posteriormente, estos promastigotes migran hasta la prosbocide y durante su viaje sufren una serie de transformaciones que lo llevan a ser promastigotes metacíclicos, forma infecciosa para los vertebrados. De esta manera cuando el flebótomo infectado se alimenta nuevamente, inocular en la dermis estos promastigotes que son fagocitados por los macrófagos comenzando nuevamente el ciclo (Figura 2).

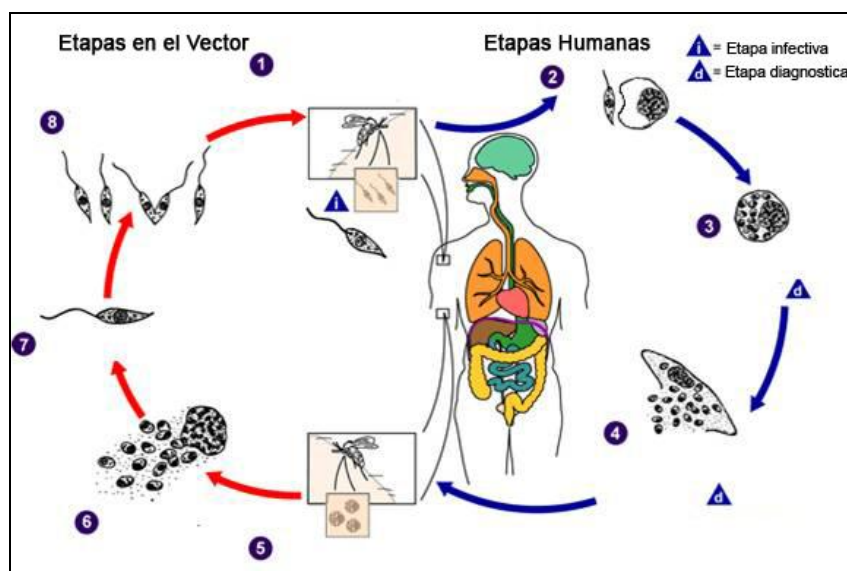


Figura 2.- Ciclo de vida de *Leishmania*: 1. El flebótomo infectado ingiere sangre del hospedador no infectado inoculando promastigotes. 2. Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos. 3. Estos se transforman en amastigotes dentro de los macrófagos. 4. Los amastigotes se multiplican dentro de los macrófagos. 5 y 6. Un flebótomo no infectado ingiere sangre y células parasitadas. 7. Los amastigotes se transforman en promastigotes en el tracto digestivo. 8. Se dividen en el tracto digestivo y migran a la prosbocis (Modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>)

1.3- ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Morfológicamente, los Kinetoplastida son organismos unicelulares, elongados en los estadios de promastigotes o esféricos en la fase amastigote con una estructura característica denominada kinetoplasto, que se extiende longitudinalmente a través de su único mitocondrion (Mendoza y col. 1996). Al igual que otros tipos de células eucariotas, los protozoarios pertenecientes a este orden, en particular los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, presentan un genoma que consiste, en al menos tres tipos de DNA en términos de replicación autonómica: DNA nuclear, el DNA mitocondrial referido como DNA del kinetoplasto y DNA circular extracromosomal (Mendoza-León y col., 1996, Mendoza-León y col, 2002).

- DNA nuclear (DNAn) o DNA genómico (DNAg): Mediante análisis previos se ha demostrado que este puede dividirse en tres componentes cinéticos: el primero de ellos consiste en secuencias repetitivas que constituyen el 25% del genoma tales como los microsatelites, secuencias telómericas y una secuencia específica de *Leishmania donovanni* denominada Lmet2 (Requena, 2008); en algunos casos se presentan hasta 100.000 copias de una misma secuencia en ciertas especies, lo que las hace un blanco atractivo para métodos de identificación en reacciones de amplificación (Mendoza-León y col, 2002). Después se encuentran las secuencias moderadamente repetidas conformando el 13% del genoma y finalmente las secuencias únicas que conforman el 60% del mismo. La información disponible muestra que el DNA haploide de *Leishmania* tiene un tamaño de aproximadamente $3.3-6.5 \times 10^7$ pares de bases (Mendoza-León y col., 1996).

- DNA del kinetoplasto (DNAk): Se encuentra dentro de un organelo denominado kinetoplasto, y se organiza en dos moléculas circulares: los maxicírculos con secuencias bastante homogéneas entre las diferentes especies y minicírculos con una gran heterogeneidad interespecífica que se entrelazan en una complicada estructura de red.
- DNA circular extracromosomal: Este tipo de DNA se asocia con procesos de resistencia a fármacos y es independiente de otros tipos de DNA (Mendoza-León y col, 1996, Mendoza-León y col, 2002).

1.4.-DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN

En el desarrollo de medidas de tratamiento y control de la enfermedad, así como en estudios epidemiológicos tales como la identificación de reservorios, distribución geográfica de especies de *Leishmania sp.* y la relación parásito-vector, el diagnóstico preciso de la enfermedad y la identificación apropiada de sus agentes etiológicos se vuelven elementos clave.

Es por esto que es indispensable la búsqueda de herramientas rápidas, simples y económicas para un diagnóstico oportuno de la leishmaniasis. Entre las metodologías que se han desarrollado sobresalen aquellas con base parasitológica ya que representan el primer nivel de detección del parásito. De estas se pueden mencionar las siguientes:

- **Diagnóstico clínico:** Es la primera aproximación que se hace para la detección de la enfermedad y depende tanto de la sintomatología que presenta el paciente como del criterio médico, por lo que su estandarización es virtualmente imposible.
- **Prueba de Montenegro:** Es una prueba intradérmica mediante la cual se mide la hipersensibilidad de inmunidad retardada a derivados antigénicos de *Leishmania* (Faber, Hay y Naafs, 2007) ya que la respuesta inflamatoria es el resultado de una reestimulación antigénica en una persona que ya ha sido expuesta a los antígenos de *Leishmania*.
- **Examen directo:** Esta técnica consiste en la visualización de los parásitos bajo el microscopio a partir de muestras clínicas tales como aspirados de médula ósea frotis de sangre o muestras de tejido teñidos con diversos colorantes como Giemsa o Hematoxilina/Eosina.
- **Cultivo:** Esta metodología pretende aislar y multiplicar el número de parásitos que inicialmente se encontraban en la muestra para posteriormente visualizarlos bajo el microscopio y llevar a cabo otros tipos de procedimientos como por ejemplo el aislamiento de DNA. Entre los medios utilizados tenemos el utilizando NNN, agar sangre y Scheneider-*Drosophila*.

Paralelo al diagnóstico por métodos parasitológicos y serológicos, en la última década se han estado implementando con mayor aceptación técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, una técnica muy sensible que con el blanco adecuado puede detectar pocas cantidades de DNA del parásito en muestras clínicas. Una prueba de este tipo es de gran utilidad durante

las primeras etapas de la infección, cuando la cantidad de parásitos es muy baja como para detectarse en un examen directo y el título de anticuerpos esta por debajo del limite de resolución de las pruebas serológicas.

Posterior al diagnostico, la identificación del parásito a otros niveles se hace necesaria porque si bien las formas principales de la enfermedad (LC, LMC y LV) pueden asociarse a distintas especies de *Leishmania*, las sub-variantes que se pueden presentar han originado dudas en el establecimiento de la correlación especie-clínica, siendo la coexistencia de especies el principal obstáculo (Lysenko y Beljaev, 1987; Luis, 1997). Esto hace necesario desarrollar técnicas que permitan una identificación específica y con la capacidad de diferenciar entre especies estrechamente relacionadas además de ser apropiadas para la aplicación en campo (Nantaluya, 1991; Mendoza-León y col., 2002). Para la caracterización de *Leishmania* se han empleado diversas metodologías que se basan en características fenotípicas o genotípicas.

Identificación fenotípica

- **Análisis de enzimas o zimodemo:** Este ensayo se basa en las diferencias de la migración electroforética de una determinada enzima de función similar (isoenzimas) en distintos aislados de estos organismos. Entre las enzimas que se utilizan se encuentran la glucosa fosfato isomerasa, la malato deshidrogenasa y la fosfo-glucomutasa que pueden diferenciar a *Leishmania (L.) major* y *Leishmania (L.) tropica* de *Leishmania (L.) infantum* (Hatam y col, 2009); mientras que otras

enzimas como la 6-fosfo-gluconato-deshidrogenasa permite la diferenciación a nivel de subgénero (Cupolillo y col, 2003).

- **ELISA:** Este inmunoensayo utiliza antígenos de *Leishmania* purificados, los cuales permiten la detección de anticuerpos aun en las etapas tempranas de la enfermedad (Faber, Hay y Naafs, 2007) tales como el K39 (Scalone, 2002) y el antígeno urinario (Bahador, 2005).

Identificación genotípica

- **Análisis de restricción:** estos estudios se basan en la variabilidad genética existente entre diversos organismos. Para la identificación de *Leishmania* mediante estos métodos, por lo general se utiliza el patrón de restricción del ADNk (análisis de esquizodemo). Este estudio presenta una serie de limitaciones, como por ejemplo, la escogencia adecuada de enzimas de restricción, ya que la variabilidad obtenida está restringida a la secuencia q que es utilizada por dichas enzimas. Este tipo de enzimas pueden ser utilizados también en secuencias particulares de DNAg como es el caso de los genes ribosomales y los genes de β -tubulina (Mendoza-León y col, 1995).

- **Hibridación de ácidos nucleicos:** uno de los análisis utilizados comúnmente para la identificación de *Leishmania* es la hibridación de DNA seguida de una transferencia Southern. Por regla general, se utiliza como blancos secuencias del DNA del kinetoplasto ya que hay aproximadamente 10^5 de estas moléculas y presentan regiones muy variables, muchas de las cuales han servido para la separación hasta nivel de especies como *L. (L.) major*, *L. (L.) infatum* y *L.*

(*Viannia*) *guyanensis* (Henk, Schallig y Oskam, 2002) y *L. (L.) chagasi* (de Lima y col, 2008), aunque también se han descrito para otro tipos de moléculas como el DNA circular extracromosomal para *L. (L.) donovani* (Henk, Schallig y Oskam, 2002).

- **Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP):** Se refiere a ensayos que utilizan enzimas de restricción asociados a la técnica de hibridación molecular; mediante este estudio se puede determinar el polimorfismo de una determinada secuencia entre un grupo de organismos (Mendoza-León y col, 1995).

- **Reacción en cadena de la polimerasa:** esta prueba se basa en la amplificación *in vitro* de una secuencia de DNA específica. Este ensayo ha demostrado ser altamente específico y sensible, siendo capaz de detectar hasta picogramos de DNA dependiendo de la secuencia amplificada. Entre los blancos descritos se encuentran el DNA del kinetoplasto, donde se tiene pruebas específicas para la amplificación del DNAk de los subgéneros *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)* (Barrio y col, 2007; Ovelle y col, 2006). También se utilizan secuencias del DNA genómico tales como el gen *hsp70* (Alvarez y col, 2009), el citocromo b (Cortez y col, 2006), el espaciador no transcrito de los genes ribosomales (Guevara y col, 1992), y las secuencias β -500 y L280, que provienen del gen de β -tubulina y que son diagnosticas de los subgéneros *L. (Viannia)* (Luis y col, 1998) y *L. (Leishmania)* (Orué y col, 2008). En la tabla 2 se describen algunos de los principales marcadores moleculares utilizados para la identificación del género *Leishmania*.

Tabla 2.- Marcadores moleculares utilizados en la identificación del género *Leishmania*.

Secuencia blanco	Nivel de identificación			
	Género	Subgénero	Especie	Cepa
β -tubulina	+	+	<i>L. panamensis</i> / <i>L. braziliensis</i>	braM2903
β -500	+	+	<i>Leishmania (Viannia)</i>	-
L280	+	+	<i>Leishmania (Leishmania)</i>	-
RNAr	+	+	-	-
DNAk	+	+	Complejos <i>L. mexicana</i> y <i>L. braziliensis</i>	-
Microsatelites	+	+	<i>Leishmania (Viannia)</i>	-
hsp70	+	+	-	-
gp63	+	+	-	-
Cisteinproteasas b	+	+	<i>L. infantum/L. donovani</i>	-
Citocromo b	+	+	-	-
Espaciador ribosomal	+	+	<i>L. garhami</i>	-

A menudo la reacción de PCR se combina con otras metodologías como el RFLP en genes como *hsp70* para la separación de *L. (V.) guyanensis* de *L. (V.) panamensis* (Alvarez y col, 2009), *gp63* para identificar a *L. (L.) infantum* (Seridi y col, 2008) y el gen de la cisteinproteasa b (*cpb*) con la enzima *DraIII* para la discriminación *L. (L.) infantum/L. (L.) donovani* (Oshaghi y col, 2009) y el gen de β -tubulina con la enzima *HindIII* para separar los subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)* (Mendoza-León, 1995). Igualmente se han desarrollado modificaciones como el PCR en tiempo real cuantitativo (qPCR), la amplificación

cuantitativa basada en ácidos nucleicos o qNASBA por sus siglas en ingles, que tiene la ventaja de poseer como secuencias blanco otras moléculas mas abundantes como el RNA ribosomal (van der Meide y col, 2008) o la amplificación aleatoria de DNA polimórfico que usa un set de iniciadores sencillos para amplificar DNA genómico y obtener un patrón de bandas que puede diferenciar hasta el nivel de cepa dependiendo de la especie evaluada.

2.- ANTECEDENTES

2.1- ESTUDIO DE LOS GENES DE β -TUBULINA

Uno de los primeros estudios realizados sobre los genes de β -tubulina se llevó a cabo utilizando la hibridación de DNA nuclear digerido con enzimas de restricción, logrando determinar la disposición de los genes de tubulina en *L. enriettii* (Landfer y col, 1983). Como resultado se obtuvo que los genes de α y β -tubulina están ubicados en arreglos independientes de secuencias repetidas en tándem de 2 y 4 kb respectivamente, sugiriendo además que todas las copias de β -tubulina se encuentran ubicadas sobre el mismo cromosoma. Tomando como referencia este estudio, otro grupo de investigadores utilizando una librería de cDNA lograron determinar que los genes de tubulina en *L. (L.) tropica* presentan entre ocho y nueve copias de aproximadamente 3.8 kb ubicadas en un arreglo en tándem y todas ellas con secuencias homólogas e inclusive idénticas entre si (Huang y col, 1984); además establecieron uno de los primeros mapas de restricción para el gen de β -tubulina en *L. (L.) tropica*.

Al año siguiente se publica un estudio empleando como modelo a *L. (L.) major* (Spithill y Samaras, 1985), encontrando resultados semejantes a los reportados por Landfear y col (1983); sin embargo, al realizar una electroforesis de campo pulsado con los fragmentos obtenidos encontraron que si bien la α -tubulina se ubica sobre el cromosoma 7, existen genes de β -tubulina en los cromosomas 6, 10, 16 y 17, concluyendo que los genes que codifican para esta proteína se encuentran tanto en arreglos en tándem como genes dispersos en cuatro loci cromosomales. Siguiendo la misma metodología, Giannini y col. (1986) trabajaron sobre el cariotipo de cuatro especies de *Leishmania* representada por diez aislados de de diferentes localidades, con la finalidad de examinar la estabilidad cromosomal en estos parásitos. Sorprendentemente las muestras provenientes de la misma subespecie aun cuando vinieran de diferentes localidades tenían tamaños de cromosomas y loci de genes de tubulina similares; pero aquellas muestras de *Leishmania* del Nuevo Mundo que provenían de diferentes subespecies o especies tenían menos de un tercio de sus cromosomas en común, por lo que demuestran que existe una variabilidad intra-especifica y que los grupos de subespecies representan un taxón valido (Giannini y col, 1986).

Das y Adhya (Das y Adhya, 1985) empleando metodologías anteriormente mencionadas describieron la organización genómica y cromosomal de los genes de β -tubulina en *L. (L.) donovani*, esta investigación arrojó resultados similares a los obtenidos para otras especies de *Leishmania* pero además fue uno de los primeros trabajos en presentar una secuencia parcial de la región de codificación

del gen, la cual resultó ser prácticamente idéntica a la de la especie *Leishmania mexicana amazonensis*.

Ivens y col (2005) hicieron la primera secuenciación del genoma completo de *L. (L.) major* utilizando paralelamente varios métodos como la secuenciación completa de cosmidos y secuenciación por “shotgun” y poco tiempo después se hicieron públicas las secuencias de los genomas de *L. (L.) infantum* y *L. (V.) braziliensis* (Peacock y col, 2007). Estas secuencias fueron la base para los trabajos de Jackson y col (2006a y b) en los cuales se evaluó *in silico* los cambios de los genes de α y β -tubulina entre distintos Tripanosomatidos como *T. brucei* y *L. (L.) major* así como la distribución de los genes de β -tubulina en *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major* y *L. (V.) braziliensis*.

2.2.- IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES

Mendoza-León y col (1995) llevaron a cabo el primer análisis comparativo del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción sobre los genes de β -tubulina, utilizando para ello varias especies de *Leishmania* perteneciente a los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* del Nuevo Mundo. Un análisis de RFLP utilizando DNA genómico y sondas heterólogas como la β -tubulina de pollo, mostró variaciones significativas entre los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*; mientras las especies del subgénero *L. (Leishmania)* presentaban poca variabilidad en sus patrones, aquellas pertenecientes al subgénero *L. (Viannia)* encontraron una gran variabilidad. Extendiendo este estudio, los investigadores encontraron en el genoma de aislados pertenecientes al subgénero *Viannia*, homología con

secuencias de β -tubulina en dos fragmentos *HindIII*; por ej. en *L. (Viannia) guyanensis* un primer fragmento tiene un tamaño de 2.4 kb al que denominaron H_1 y otro de 3 kb que nombraron H_2 ; mientras que para el caso de *L. (Leishmania) mexicana* encontraron solo un fragmento *HindIII* de 3.4 kb que llamaron H_3 (Figura 3).

Con la finalidad de evaluar el polimorfismo de los genes de la beta tubulina dentro del subgénero *Viannia*, estos investigadores clonaron la región H_1 proveniente del DNA total de *L. (V.) guyanensis* obteniendo un recombinante que designaron como pLg β 4; este recombinante contiene el gen completo de β -tubulina junto con las regiones adyacentes a los extremos 5' y 3' lo que les permitió obtener un mapa de restricción de este fragmento.

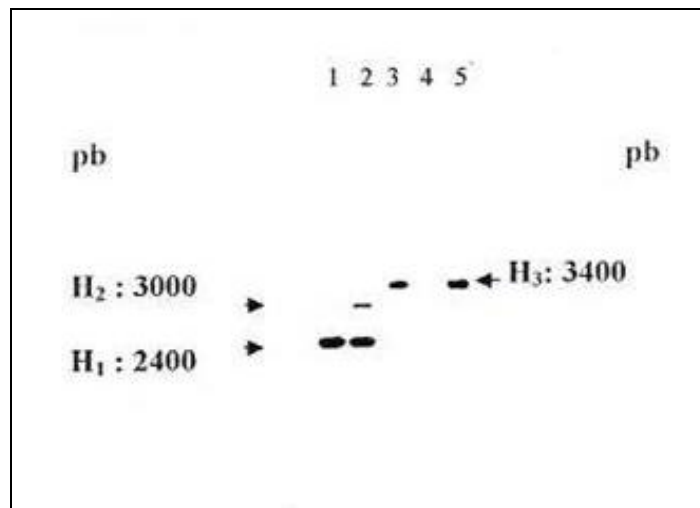


Figura 3.- Regiones de β -tubulina en *Leishmania sp.* El DNA genómico de varias especies representativas de los subgéneros *Leishmania* (líneas 3-5) y *Viannia* (líneas 1 y 2) fue digerido con la enzima *HindIII* e hibridado con la sonda heteróloga de β -tubulina de pollo. (Tomado de Mendoza-León, 1991).

De acuerdo a estos resultados, los investigadores concluyeron que este polimorfismo se debía a mutaciones al azar de la región que contenía estos genes. Este mismo análisis, también les permitió observar una variación lo suficientemente significativa como para distinguir entre las especies de *Leishmania* del Viejo y del Nuevo Mundo.

Siguiendo con esta línea de estudio, Luis y col. (2001) demostraron la presencia de una secuencia derivada del clon pLg β 4, la cual denominaron β 500. La misma fue sub-clonada como un fragmento *Pst*I de 500 pares de bases de la región 5' que bordea el gen de la beta tubulina en el clon pLg β 4 (Luis y col, 2001). Estudios de hibridación probaron que esta secuencia es exclusiva del subgénero *Viannia* (Figura 4A). Estos mismos investigadores al realizar ensayos de PCR que tenían como blanco esta secuencia demostraron su utilidad como marcador molecular de las especies del subgénero *Viannia* (Mendoza-León y col, 2002). Experimentos de hibridación utilizando pLg β tub1, un clon que lleva la secuencia de codificación de β -tubulina como sonda determinaron que los fragmentos H₁ y H₂ comparten secuencias del gen de β -tubulina, pero al realizar hibridaciones con β 500 como sonda esta solo se encontraba presente en el fragmento H₁ (Figura 4B).

Tomando esto como base, en el trabajo realizado por Cuervo (Cuervo, 2008) se realizó una digestión con la enzima de restricción *Hind*III del genoma de *Leishmania* (*Viannia*) y se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 3 kb que fueron posteriormente insertados en el vector pUC19 y clonados en células de *E.coli*. Evidencias preliminares obtenidas a partir de ensayos de PCR Tub₁/Tub₆ y

secuenciaciones parciales sugieren la presencia de β -tubulina y una secuencia potencialmente similar a β 500 en cuanto a funciones de marcador molecular.

2.3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente el diagnóstico de la enfermedad se realiza en primera línea evaluando el cuadro clínico; pero en ocasiones puede ocurrir que las lesiones agudas se confundan con otros tipos de problemas dermatológicos tales como la esporotricosis, úlceras tropicales, lepra y cáncer de piel (Weigle y col., 2002) o bien que los síntomas que se presentan son causados por otros patógenos como *Streptococcal hypoderma* (Routerau y col., 2006).

Desde el punto de vista inmunológico numerosas aproximaciones se aplican para el diagnóstico de la LV tales como las pruebas de aglutinación directa y kits de inmuno cromatografía, los cuales tienen la ventaja de solo requerir un mínimo de experiencia para su aplicación y muestran una alta sensibilidad y especificidad (Chappuis y col, 2006). La desventajas es que la presencia de un anticuerpo indica solamente la exposición a la infección pero no necesariamente una infección activa y es posible que no se detecte una respuesta inmunológica adecuada si el paciente esta inmuno-comprometido (Howard y col, 1990). La prueba de Montenegro se mantiene como un estándar para el diagnóstico de la LC pero entre sus principales desventajas se cuenta que diferentes preparaciones antigénicas impactan la sensibilidad de la prueba (Reithinger y Dujardin, 2007), además de que puede resultar negativa en infecciones tempranas y en pacientes con LC producida por *L. (L.) amazonensis*.

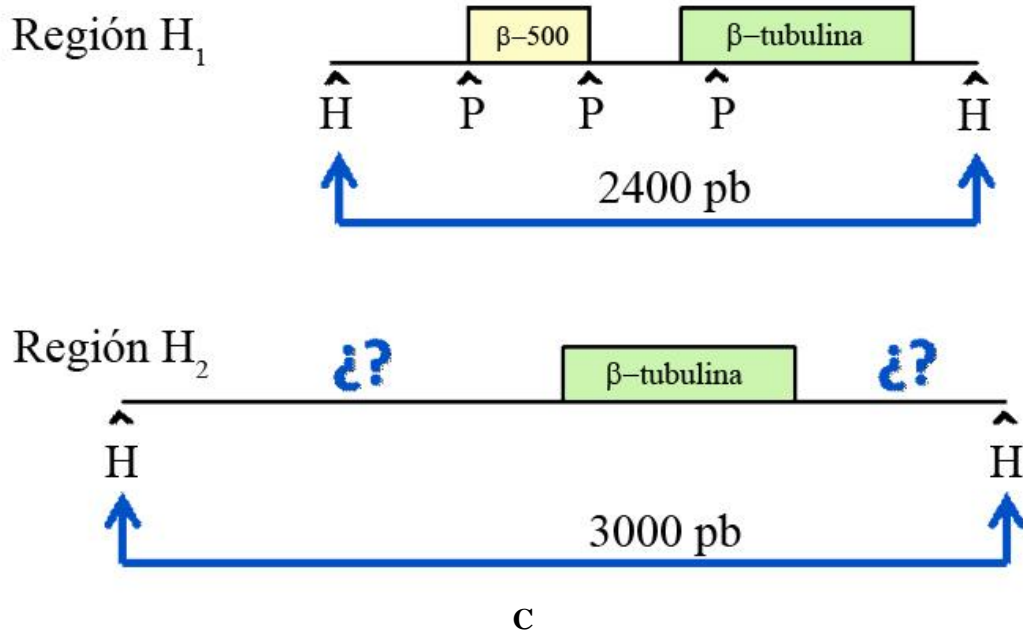
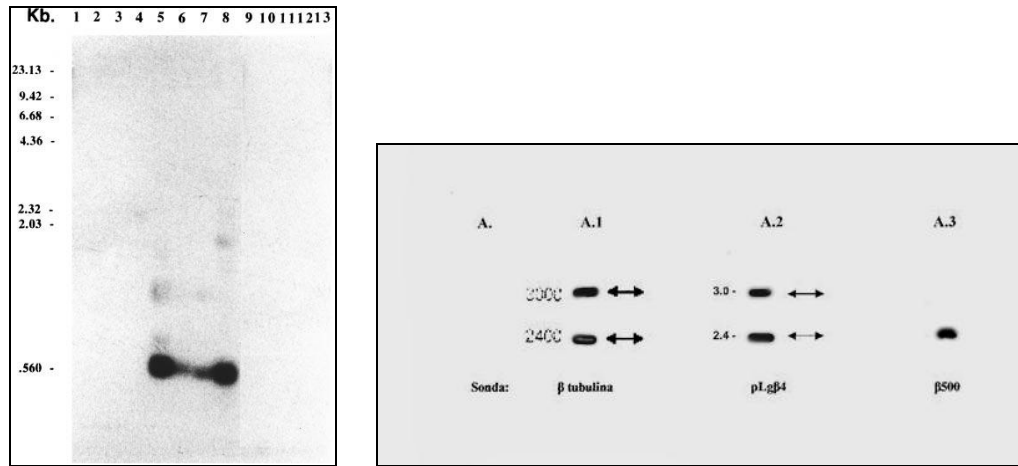


Figura 4.- A: Especificidad de la región β500. Líneas 1-4 especies representativas del subgénero *Leishmania*; Líneas 5-8: especies representativas del subgénero *Viannia*; Líneas 11-13 Otros Kinetoplastida (Tomado de Luis, 2000). B: Región de β-tubulina en *L. (V.) guyanensis*. C: Esquema de la organización de las secuencias asociadas a β-tubulina en las regiones H₁ y H₂. H: sitio de corte de la enzima *HindIII*; P: sitio de corte de la enzima *PstI*; ¿?: desconocimiento de la zona en términos de secuencia. (Modificado de Cuervo, 2008)

En términos de la detección directa del parásito se incluye el examen de los amastigotes en frotis de sangre teñidos con Giemsa; si bien una metodología fácil y económica tiene poca sensibilidad debido al bajo número de parásitos presentes normalmente en las muestras además de requerir mucho tiempo y experiencia en el manejo de las mismas. A pesar de ello esta técnica se mantiene como el estándar en muchos países en vías de desarrollo ya que metodologías más sofisticadas son más costosas o no están disponibles (Reithinger & col., 2007). El cultivo de biopsias y aspirados aunque mas sensible, requiere de materiales sofisticados y aun los protocolos mas meticulosos solo son positivos en el 70%-75% de los casos cuando se realizan en condiciones optimas (Navin y col., 1990; Weigle y col., 2006) además de no permitir la identificación a nivel de especie. Los métodos indirectos tales como el serodemo, análisis de isoenzimas y la identificación por anticuerpos monoclonales han probado tener mayor sensibilidad en la detección del parásito en comparación a las técnicas antes mencionadas (Grimaldi, 1987). El cultivo combinado con el análisis por electroforesis de enzimas de múltiples locus (EMM por sus siglas en ingles) permite la identificación y caracterización a nivel de especie; sin embargo, requiere personal especializado además de que los resultados se pueden ver afectados por procedimientos de aislamiento y mantenimiento *in vitro* (Reithinger y Dujardin, 2007).

Como se puede observar estas pruebas se ven sujetas a una fuerte variación por estar basadas en características fenotípicas. En épocas recientes, los esfuerzos se han enfocado en el desarrollo de metodologías específicas fundamentadas en

marcadores genotípicos que permitan tanto la detección como la identificación del parásito, ya que estos son estables a lo largo del ciclo de vida del parásito lo que los convierte en parte integral de los estudios epidemiológicos de muchos agentes infecciosos (Traub, 2005).

Entre algunas de estas metodologías se encuentra el análisis del patrón cromosómico, el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y la hibridación de ácidos nucleicos; notándose en la última década un incremento en el desarrollo de protocolos basados en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Esta técnica se basa en la amplificación de una secuencia específica de DNA, por lo que teóricamente con el blanco apropiado se puede separar hasta nivel de especie un organismo de otro. Para el caso de *Leishmania*, se han utilizado secuencias del DNA del kinetoplasto (DNAk), pero debido a una rápida evolución de las mismas los esfuerzos se orientan hacia el DNA nuclear, cuyos marcadores son mucho más estables a lo largo del tiempo. Entre estos marcadores podemos mencionar los genes del miniexón, genes de la sub unidad pequeña del RNA ribosomal, ciertas secuencias teloméricas, microsatélites, los genes *gp63* y *hsp70* y las regiones de los genes de β -tubulina.

Los genes que codifican para la β -tubulina, una de las proteínas componentes de los microtúbulos de eucariotas, poseen una regulación diferencial durante los estadios del parásito además de que estos pertenecen a familias multigénicas y están altamente conservados en la escala evolutiva, características que los hicieron blanco apropiado para su evaluación como posibles marcadores moleculares. Estudios previos han determinado mediante análisis de RFLP que

estas secuencias presentan la variabilidad suficiente como para distinguir los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (Mendoza-León y col, 1995).

En el trabajo realizado por Cuervo (Cuervo, 2008), un fragmento asociado a estos genes denominado H₂ de aproximadamente 3 kb y que contiene la región codante del gen de β -tubulina se clonó en células de *E. coli* y evidencias preliminares demostraron la potencialidad de este como marcador molecular. Es por tanto que se planteó como hipótesis de este proyecto la existencia de diferencias entre las secuencias adyacentes al gen de β -tubulina del fragmento H₂ y otro previamente caracterizado llamado H₁ (Luis, 1997).

3.- OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la variabilidad de las regiones adyacentes al gen de β -tubulina en un fragmento *Hind*III de 3 kb denominado H₂ proveniente del DNA genómico de *Leishmania (Viannia)*, e inserto en el vector pUC19, en términos de su potencialidad como marcador molecular del subgénero *Viannia*.

3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia del gen de β -tubulina mediante ensayos de PCR y secuenciación en plásmidos recombinantes que contienen el fragmento H₂ de *L. (Viannia)*.
- Secuenciar las regiones 5' y 3' adyacentes al gen de β -tubulina de plásmidos recombinantes que contengan la región H₂ de *L. (Viannia)*.
- Determinar la potencialidad como marcador molecular de las regiones 5' y 3' indicadas mediante ensayos de PCR, utilizando DNA genómico de distintos aislados del género *Leishmania*.
- Realizar un análisis *in silico* de los fragmentos *Hind*III que contengan secuencias de β -tubulina en los genomas de *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) infantum* y *L. (Leishmania) major*.*

***Este objetivo fue sugerido por el jurado posterior a la presentación del Seminario II**

CAPITULO II

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- MATERIALES

Reactivos

Las soluciones se prepararon con reactivos provenientes de las casas comerciales Promega, Gibco BRL y QIAGEN con grado Biología Molecular o similar.

Enzimas de Restricción

Se utilizó la enzima *Hind*III de la casa comercial Gibco BRL; esta enzima presenta el siguiente sitio de reconocimiento: 5'-AAGCTT- 3' (Numero de catalogo 15207038).

Organismos

- **Cepa bacteriana**

E. coli DH5 α : F-, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1.

- **Cepas de *Leishmania***

Las características de cada una de las cepas evaluadas se describen en la Tabla 3.

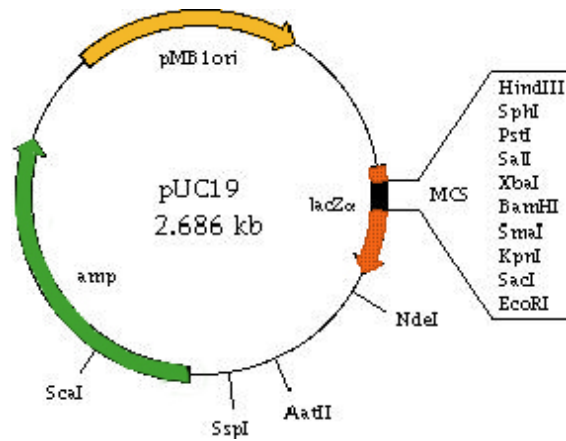
Tabla 3.- Designación y origen de las cepas según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Subgénero	Especie	Designación de la cepa	Abreviatura	Origen
<i>L. (Viannia)</i>	<i>guyanensis</i> *	MHOM/BR/75/M4147	M4147	Brasil
	<i>braziliensis</i>	MHOM/BR/75/2903	2903	Brasil
	<i>braziliensis</i> *	MHOM/BR/75/M2904	2904	Brasil
	<i>panamensis</i>	MHOM/?/?/UA140	UA140	Panamá
<i>L.(Leishmania)</i>	<i>garnhami</i>	MHOM/VE/76/JAP78	JAP	Venezuela
	<i>major</i> *	MHOM/IL/81/Friedlin	Friedlin	-
	<i>infantum</i> *	MCAN/ES/98/LLM-877	JPCM5	-
<i>Trypanosoma brucei</i> *		TREU927/4	TREU927	-

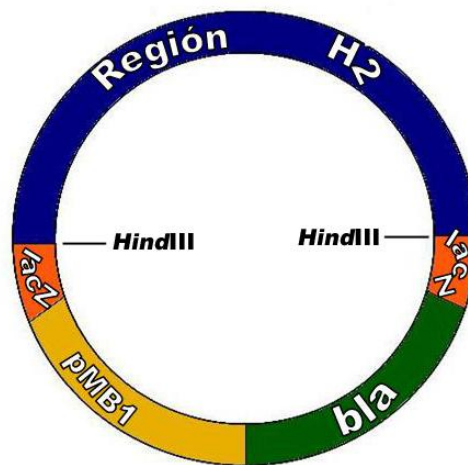
* Cepas utilizadas para análisis *in silico*

Muestras de DNA

- Plásmido pUC19 (Figura 5A)
- Plásmido pUC19 con el inserto de interés, obtenido y mantenido en células de *E. coli* DH5 α (Figura 5B) (Cuervo, 2008).
- DNA total de las cepas M4147, M2903, UA140 y JAP (Tabla 1).
- Marcadores de peso molecular 1kb ladder y λ -*Hind*III (Gibco BRL).



A



B

Figura 5.- A: Vector pUC19. B Vector pUC19 recombinante/organización hipotética de la region H₂; H₂: región H₂ de 3kb; lacZ: gen que codifica para la β-galactosidasa; bla: gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina; pMB1: origen de replicación del plásmido.

4.2.- METODOLOGÍAS

4.2.1.- DIGESTIÓN DE AISLADOS PREVIOS DE DNA GENÓMICO DE CEPAS DE LEISHMANIA CON LA ENZIMA *HINDIII*

La digestión con la enzima *HindIII* del DNA genómico de las cepas de *Leishmania* mencionadas en la tabla 1 se realizó bajo las condiciones recomendadas por la casa comercial. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 37 °C y se continuó, previa precipitación del DNA y ajuste con solución de reacción fresca, con una nueva reacción con la misma enzima por dos horas adicionales para asegurar la digestión completa de la muestra. El DNA se precipitó utilizando 2,5 vol. de etanol al 100% y 0,5 vol. de Acetato de Amonio 7,5M; la mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos para ser resuspendida en 20 µl de agua mili-Q.

4.2.2.- ELECTROFORESIS

Las muestras de DNA se colocaron en geles de agarosa 1% en buffer TBE (Tris-HCl 90mM, pH 8,2; ácido bórico 90mM; EDTA 2mM). Las condiciones bajo las cuales se llevaron a cabo las electroforesis fueron:

- Electroforesis a 100 V durante 40 minutos para evaluar la integridad del DNAg.
- Electroforesis a 50 V durante 21 horas para separar los fragmentos de restricción *HindIII* del DNAg.

- Electroforesis a 100 V durante 40 minutos para determinar la presencia de los fragmentos de interés.
- Electroforesis a 100 V durante 40 minutos para la evaluación de los productos de PCR.

Finalmente el gel se tiñó con Bromuro de Etidio y los resultados se visualizaran en un Transiluminador UV, obteniéndose el registro fotográfico en una cámara Kodak EDAS 290.

Posterior a la electroforesis, la ubicación de las regiones de 3 kb (H₂) y 2.4 kb (H₁) para las cepas del subgénero *Viannia* y 3.4 kb (H₃) para la cepa del subgénero *Leishmania* se determinó mediante la comparación con la migración DNA del fago λ digerido con la enzima *HindIII*; previa elaboración de una curva de calibración de migración en cm vs. logaritmo del peso molecular del marcador.

4.2.3.- EXTRACCIÓN DEL DNA A PARTIR DE UN GEL DE AGAROSA

Las regiones de interés se escindieron directamente del gel y los trozos de agarosa se colocaron en tubos Eppendorf de 0.5 mL, previamente perforado en su base y con un tamiz de lana de vidrio. Este tubo se colocó dentro de otro tubo Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó en tres rondas de 30 segundos cada una. El DNA se precipitó agregando 0,1 volúmenes de Acetato de Amonio 7.5 M y 2.5 volúmenes de etanol al 100% y se resuspendió en un volumen final de 25 μ L de agua mili-Q.

4.3- CLONAMIENTO

4.3.1- FORMACIÓN DE LA MOLÉCULA DE DNA RECOMBINANTE

El vector pUC19 se digirió con la enzima de restricción *Hind*III para formar una molécula lineal con extremos compatibles a los presentes en el pool de fragmentos de aproximadamente 3 kb; estos fragmentos se ligaron al vector utilizando la T4 ligasa de Gibco BRL (figura 5B). En la tabla 4 se muestran las condiciones del ensayo.

Tabla 4.- Condiciones del ensayo de ligamiento. La reacción se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4°C y se completó hasta un volumen final de 25 µL.

Componente	Cantidad (µL)
Buffer de ligamiento 5X (GibcoBRL)	5 µL
Vector	3 µL
Inserto	5 µL y 7 µL
Ligasa T4	1 µL

4.2.5.- PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN

Se realizó un crecimiento previo de la cepa de *E. coli* DH5α a partir de una colonia aislada inoculada en 4 mL de caldo LB suplementado con ampicilina a 120 µg/mL (Cuervo, 2008) e incubando con agitación a 37°C durante toda la noche. Este cultivo se centrifugó a 5000g durante 10 minutos a 4°C descartando el sobrenadante y se resuspendió en 2 mL de Solución Salina (0,85%). Las células fueron centrifugadas nuevamente a 5000g durante 10 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió suavemente en 10 ml de MgCl₂ 50 mM frío. Se colocaron en hielo

durante 10 minutos y se centrifugaron nuevamente a 5000g por 10 minutos descartando el sobrenadante; este sedimento fue resuspendido en 2 ml de CaCl₂ 50 mM frío.

Para realizar la transformación se tomaron 5 µl y 7 µl de la mezcla de ligamiento con 200 µL de células químicamente competentes y incubaron en hielo durante 60 minutos para después realizar un choque térmico colocándolas a 45°C durante noventa segundos exactos; posteriormente se agregó 2 mL de medio LB y se colocaron a 37°C por 30 minutos y se realizó una última centrifugación a 5000g y 4°C durante cinco minutos; este sedimento se resuspendió en 500 µL de LB y ampicilina

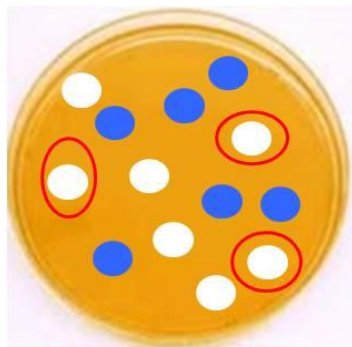
4.2.6.- SELECCIÓN DE RECOMBINANTES

Se sembraron alícuotas de 100 µL y 200 µL en placas de agar LB suplementadas con ampicilina (120 µg/mL), 40 µL del sustrato cromogénico X-Gal (20 mg/mL en dimetilformamida) y 4 µL del inductor IPTG (200 mg/mL) (Sambrook y col., 1989; Cuervo, 2008) y se incubaron a 37 °C durante 48 horas.

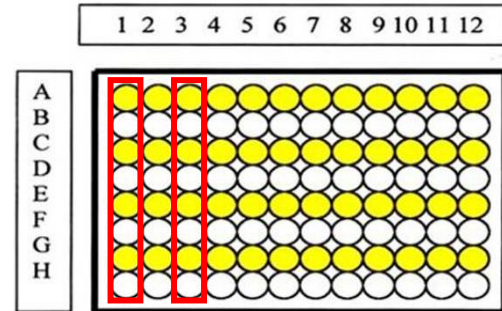
Las colonias recombinantes se diferenciaron por su coloración blanca, claramente diferenciable de las colonias azules no recombinantes.

4.2.7.- CULTIVO DE BACTERIAS PORTADORAS DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES CON DNA GENÓMICO DE *LEISHMANIA (VIANNIA)*.

Las colonias recombinantes se colocaron en placas de ELISA de 96 pozos en un volumen no mayor a 250 μ L de caldo LB más ampicilina (120 μ g/mL). Posteriormente se realizó una mezcla a volúmenes iguales de los 8 pozos de cada columna para tener un total de 12 mezclas de recombinantes, cada una de las cuales se inoculó en 3 mL de caldo LB suplementado con ampicilina para ser incubados en agitación a 37°C durante toda la noche, con la finalidad de realizar una extracción de DNA extracromosómico y evaluar la presencia del gen de la β -tubulina mediante un ensayo de PCR Tub₁/Tub₆ (Cuervo, 2008). De aquellas columnas positivas para esta primera reacción de PCR se seleccionó una mezcla de 2 pozos por columna para un nuevo ensayo de PCR realizando los pasos mencionados. Una vez más, de las mezclas positivas para la presencia de β -tubulina se seleccionó los pozos individuales para realizar un tercer ensayo de PCR (Figura 6).

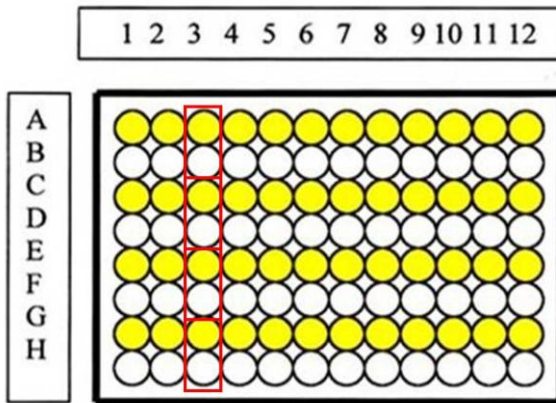


Placa Matriz

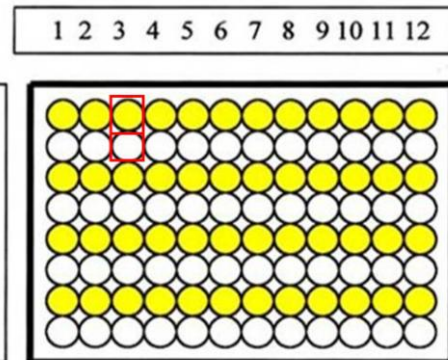


Placa de selección de recombinantes

Mezclas de clones para primer ensayo
PCR Tub₁/Tub₆



De aquellas columnas positivas se hace una nueva mezcla para un segundo ensayo de PCR



De los pares de clones positivos en la segunda ronda se evalúa cada clon por separado en un tercer ensayo de PCR

Figura 6.- Esquema representativo de la selección y evaluación de clones

4.2.8.- AISLAMIENTO DE DNA EXTRACROMOSÓMICO A PARTIR DE CÉLULAS DE *E. coli* Y AMPLIFICACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR DE LA SECUENCIA DE β -TUBULINA

De un cultivo previo de los recombinantes seleccionados en medio LB con ampicilina, se tomaron 2 mL y se procedió a la extracción del DNA plasmidico mediante el QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Las reacciones de amplificación mediante PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L para amplificar la región de β -tubulina tanto en los plásmidos recombinantes como en el DNA total de la cepa JAP utilizado como control positivo del ensayo. El producto de amplificación esperado es de 900 pb cuyo tamaño se evaluó en un gel de agarosa bajo las condiciones previamente descritas. En las tablas 5, 6 y 7 se muestran las cantidades de reactivos a ser utilizados, la composición de MASTER MIX (Promega) y las secuencias de los oligonucleótidos empleados.

Tabla 5.- Volúmenes utilizados para el ensayo de PCR. El volumen total (25 μ L) se completa con agua milli-Q.

Reactivo	Volumen μ L	Concentración final
DNA blanco	1	5 ng/ μ L
Tub ₁	1	10 μ M
Tub ₆	1	10 μ M
MasterMix (Promega)	12,5	-

Tabla 6- Características de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de la región de β -tubulina (Modificado de Cuervo, 2008)

Oligonucleotido	Secuencia	Tm (°C)
Tub ₁	5'-ATGCGTGAGATCGTTTCC-3'	54
Tub ₆	5'-GGCGGCCTGCATCAT-3'	40

Tabla 7.- Componentes de la MASTER MIX (Promega)

Componente	Concentración
Tris-HCl (pH 8.4)	22mM
KCl	55mM
MgCl ₂	1,65 mM
dGTP	220 μ M
dATP	220 μ M
dTTP	220 μ M
dCTP	220 μ M
Taq DNA polimerasa	22 U

4.2.10 ANÁLISIS *IN SILICO*

La ubicación del gen de β -tubulina se determinó mediante la comparación de la secuencia codificante (CDS) de dicho gen proveniente de *Leishmania (V.) guyanensis* cepa 4147, depositada en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) contra la base de datos de especies de *Leishmania*, utilizando la aplicación nucleotide BLAST disponible en el sitio web del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sin modificar los parámetros del algoritmo de búsqueda. Los números de acceso de todas las secuencias empleadas se encuentran listados en el Anexo 1.

Para hacer las evaluaciones posteriores se tomaron aquellas secuencias que correspondían a cromosomas completos, con un valor de E igual a cero y un porcentaje de identidad de 95%-100%; una vez obtenidas las secuencias se hizo una digestión hipotética con la enzima de restricción *HindIII* en el programa BioEdit y los fragmentos obtenidos se contrastaron con la secuencia de β -tubulina mediante el programa nucleótido BLAST.

CAPITULO III

5.-RESULTADOS

5.1.-EVALUACIÓN DE RECOMBINANTES DE *E. coli* QUE CONTIENEN LA REGIÓN H₂

En el procedimiento realizado por Cuervo (Cuervo, 2008) se logró clonar la región H₂ del DNAg de la especie de *Leishmania (V.) guyanensis* 4147 utilizando el vector pUC19. La presencia de dicha región se demostró realizando un ensayo de PCR con los oligonucleótidos Tub₁/Tub₆ que amplifican una sección del gen de β -tubulina. Sin embargo ensayos posteriores realizados bajo las mismas condiciones sobre distintos clones no produjeron resultados positivos para la presencia de β -tubulina sugiriendo la pérdida del clon. En respuesta a esto se decidió realizar nuevamente un pool de clones de la librería original y tras ensayos de amplificación se obtuvieron bandas muy tenues correspondientes al producto de de amplificación de 900 pb esperado (Figura 7A). La evaluación individual de cada uno de estos clones en todos los casos fue negativa o en otras palabras en estos recombinantes no se podía evidenciar la presencia de el gen de β -tubulina mediante el ensayo de PCR (Figuras 7B y 7C). Entre las razones a las que se atribuye este resultado se puede mencionar la manipulación inadecuada de los clones, lo que conllevó a la contaminación de los mismos y finalmente a la pérdida de la librería, así que en respuesta se decidió construir nuevamente una librería que contuviese la región H₂ utilizando el DNAg de las cepas de *Leishmania (V.) panamensis* UA140 y *Leishmania (V.) guyanensis* 4147.

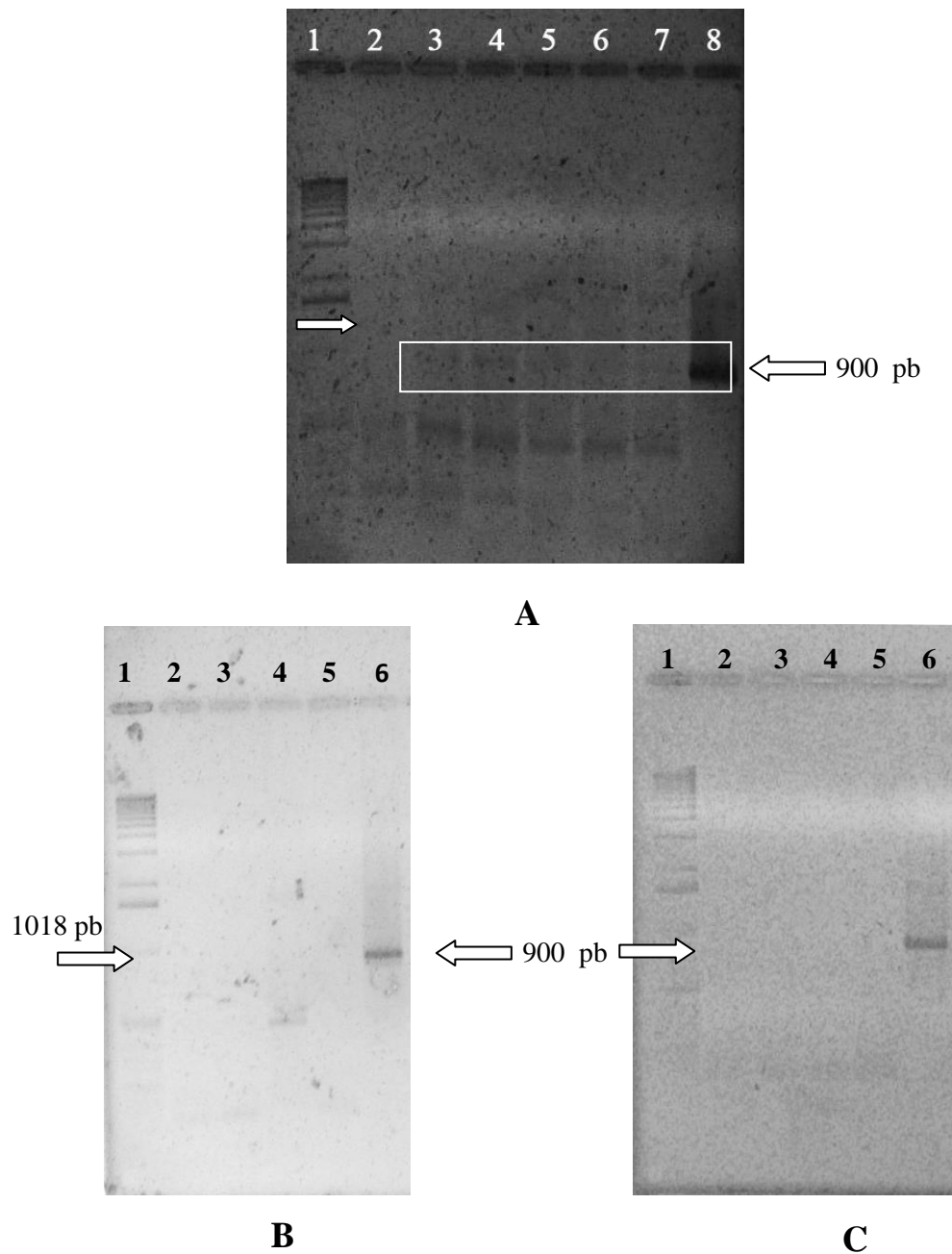


Figura 7.- A: Amplificación de β -tubulina a partir de un pool de clones de la librería original de la región H₂ de *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Línea 1: marcador de peso molecular 1 kb ladder; Línea 2: clones A5-A8; Línea 3: clones B5-B; Línea 4: clones C5-C8; Línea 5: clones D5-D8; Línea 6: clones E5-E8; línea 7: clones F5-F8; Línea 8: Control positivo DNA genómico JAP. **B y C: Amplificación de β -tubulina a partir de un pool de clones individuales que contienen en la región H₂ B: Línea 1: marcador de peso molecular 1kb ladder; Línea 2: C5; Línea 3: C6; Línea 4: C7; Línea 5: C8; Línea 6: Control positivo DNAg JAP. C: Línea 1: marcador de peso molecular 1 kb ladder; Línea 2: E5; Línea 3: E6; Línea 4: E7; Línea 5: E8; Línea 6: Control positivo DNAg JAP; Línea 7: Control negativo.**

5.2.- CONSTRUCCIÓN DE UNA LIBRERÍA QUE CONTIENE LA REGIÓN H₂.

Siguiendo la metodología ya descrita (ver materiales y métodos) se obtuvieron los fragmentos correspondientes a las regiones H₁ y H₂. En la figura 8 se muestra la integridad del DNA de varias cepas del subgénero *Viannia* y una del subgénero *Leishmania* observándose una banda de alto peso molecular correspondiente al DNAg y otras de menor peso que coincide con el tamaño esperado para los minicírculos (Cuervo, 2008; Mendoza-León, 1991)

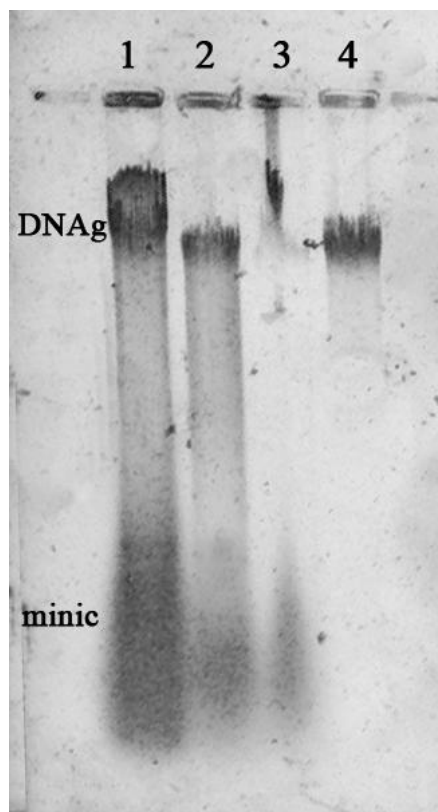


Figura 8.- Evaluación de la integridad del DNA genómico de varias especies de *Leishmania sp.* DNAg: DNA genómico; minic: minicírculos. Línea 1: DNA total cepa UA140; Línea 2: DNA total cepa 4147; línea 3: DNA total cepa Mª rojas; Línea 4: DNAg cepa JAP.

Tanto en el DNAg como el DNA digerido con *Hind*III fue utilizado para llevar a cabo un ensayo de PCR Tub₁/Tub₆ con la finalidad de evaluar la integridad del gen de β -tubulina. Los resultados obtenidos coinciden con el amplificado esperado (Figuras 9A y 9B).

El DNA-*Hind*III se colocó en un gel preparativo a fin de separar adecuadamente los fragmentos de 2,4 kb y 3 kb de las cepas pertenecientes al subgénero *Viannia* (Figura 10); tras el proceso de purificación se obtuvieron los fragmentos de 2,4 kb y 3 kb para la cepa UA140, los cuales se sometieron a una amplificación Tub₁/Tub₆ para confirmar que correspondiesen a las regiones de interés no solo en tamaño sino también por la presencia del gen β -tubulina (Figuras 11A y 11B).

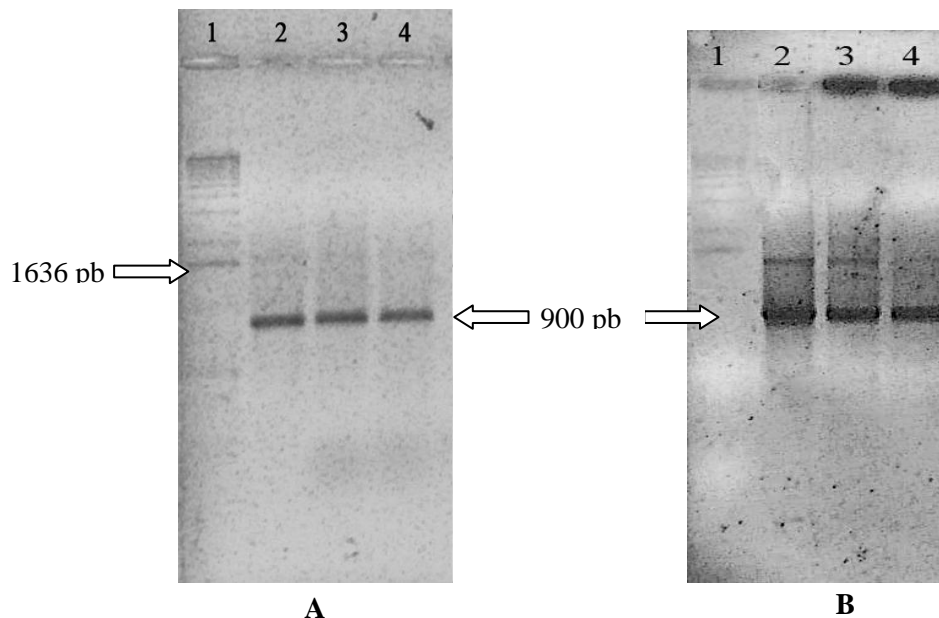


Figura 9.- Electroforesis productos de PCR Tub₁/Tub₆ del DNAg de varias cepas de *Leishmania* (*Viannia*).- **A: DNA sin digerir.** Línea 1: Marcador de peso molecular 1kb ladder; Línea 2: JAP; Línea 3: Cepa 2903; Línea 4: Cepa M4147. **B: DNA Digerido.** Línea 1: Marcador de peso molecular 1kb ladder; Línea 2: control positivo DNAg JAP sin digerir; Línea 3: Cepa JAP; línea 4: Cepa UA140.

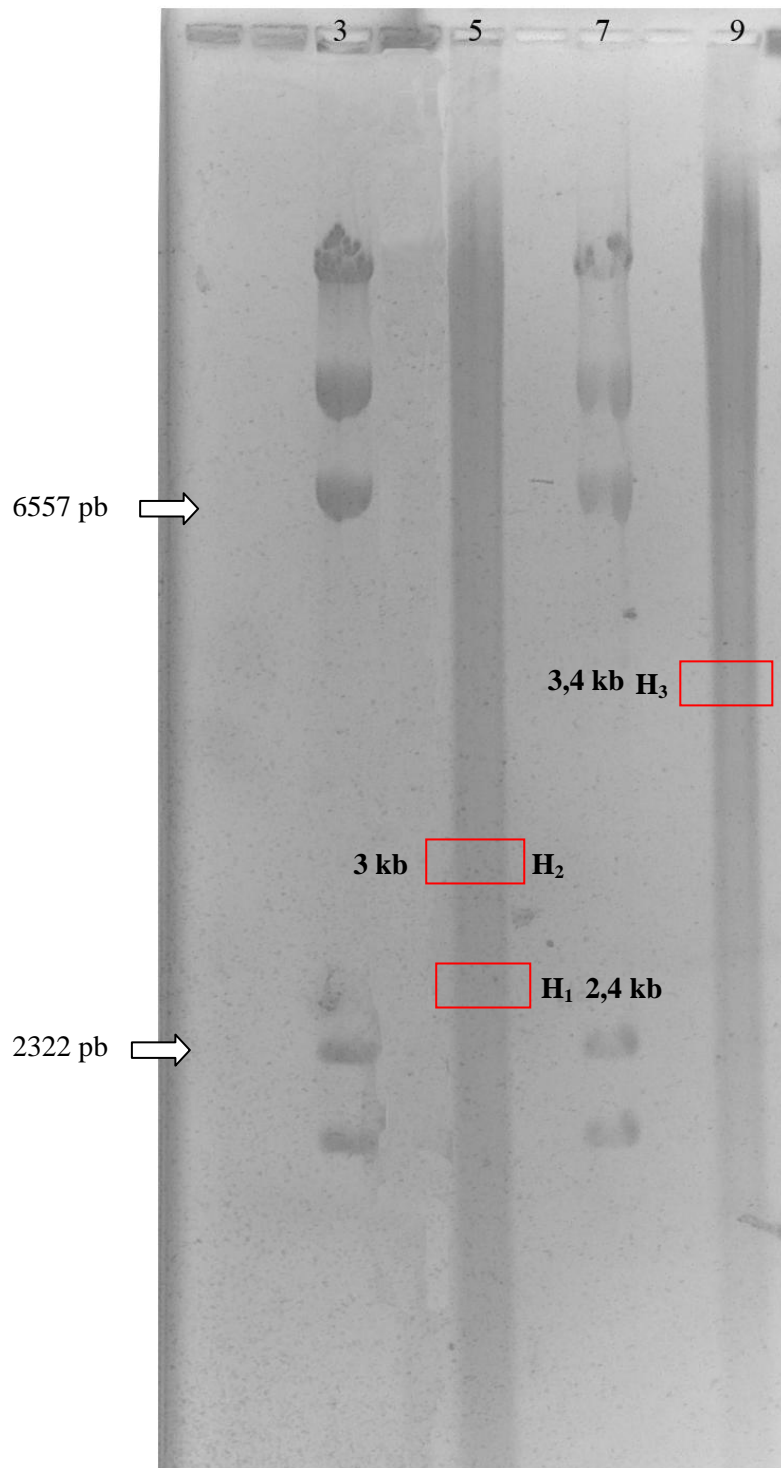
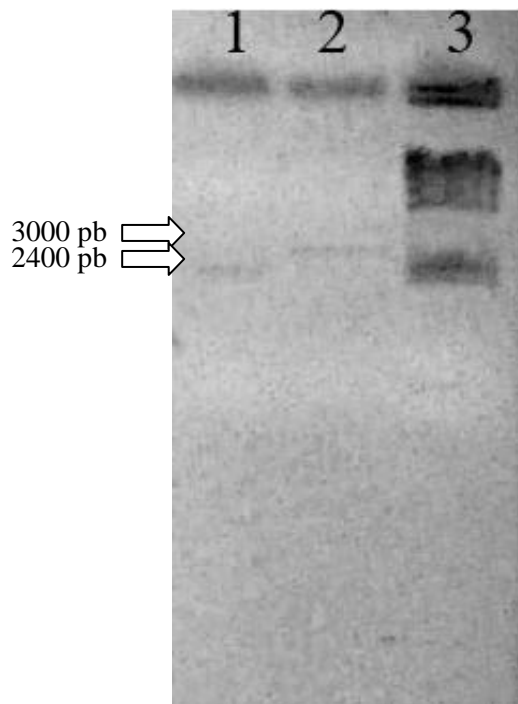
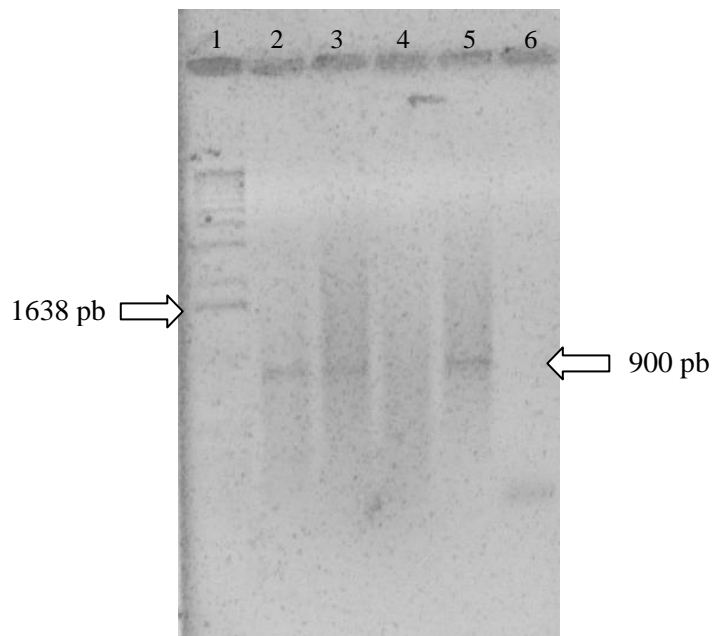


Figura 10.- Digestión con la enzima de restricción λ -HindIII. Se muestra la posición de los fragmentos H₁, H₂ y H₃. Líneas 3 y 7: marcador de peso molecular DNA λ -HindIII; Línea 5: Cepa UA140; Línea 9: Cepa JAP.



A



B

Figura 11.- A: Electroforesis de las regiones H₁ y H₂ purificadas. Línea 1: Fragmento 2,4 kb Cepa UA140; Línea 2: Fragmento 3 kb Cepa UA140; Línea 3: Marcador de peso molecular DNA λ -HindIII. **B: Electroforesis de la amplificación Tub₁/Tub₆.** Línea 1: marcador de peso molecular 1kb ladder; Línea 2: Fragmento 2,4 kb; Líneas 3 y 4: Fragmento 3 kb; Línea 4; Línea 5: DNAg JAP; Línea 6: control negativo.

Una vez corroborada la identidad de las regiones de interés se procedió con la inserción de H₂ en el plásmido pUC19. En el clonamiento se obtuvieron tanto colonias azules (no recombinantes) como blancas (recombinantes) usando el sistema X-Gal/IPTG; sin embargo, ninguna de estas arrojó resultados positivos con el ensayo Tub₁/Tub₆ por lo que no fué posible realizar los ensayos subsecuentes que se habían establecido. Debido a este obstáculo y tomando en cuenta que ya se tenía la secuencia del genoma completo de varias especies de *Leishmania sp.* se decidió hacer un análisis *in silico* del gen de β -tubulina como una forma de aproximación a la región de interés.

5.3.- ANÁLISIS *IN SILICO* DE REGIONES *HINDIII* QUE CONTIENEN GENES DE β -TUBULINA

Se llevó a cabo, bajo las condiciones antes descritas, un alineamiento usando como patrón la secuencia codante del gen de β -tubulina de *L. (V.) guyanensis* (Luis y col., 2006) contra la base datos de organismos representativos de la familia Trypanosomatidae actualmente disponible como *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* (Peacock y col, 2007), *L. (L.) major* (Ivens y col, 2005) y *Trypanosoma brucei* (Berriman y col 2005). El genoma de estas especies completamente secuenciado, el valor de E (probabilidad de que la correspondencia entre ambas secuencias sea por azar) igual a cero y un porcentaje de identidad de 96%-99% para *Leishmania sp.* y 86% para *T. brucei*, son características que permitieron el análisis individual de cada genoma para precisar la ubicación física del gen y realizar una digestión *in silico* con la enzima *HindIII*.

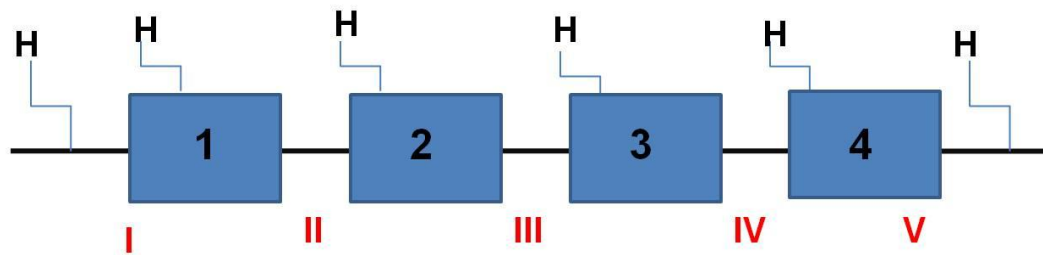


Figura 12.- Organización del gen de β -tubulina en el cromosoma 1 de *Trypanosoma brucei*. 1: Tb927.1.2330; 2: Tb927.1.2350; 3: Tb927.1.2370; 4: Tb927.1.2390. H muestra los puntos de corte con la enzima *HindIII*. I-V: fragmentos de 3642 pb.

En el genoma de *Trypanosoma brucei* se encontró un único locus de β -tubulina ubicado en el cromosoma 1. Este locus consiste de una repetición en tándem de aproximadamente 4 genes coincidiendo con lo reportado por Jackson (Jackson y col, 2006b). Estos genes mostraron un valor de coincidencia del 86% con respecto al patrón de *L. (V.) guyanensis* y ambas secuencias fueron completamente distintas los primeros 21 nucleótidos. En el nucleótido 466 del gen de *T. brucei* ocurre una sustitución de una Guanina (G) por una Timina (T) que es resaltante ya que provoca la aparición de un sitio *HindIII* dentro de la región codante del gen por lo cual se generan 5 fragmentos de aproximadamente 3642 pb. Todos los genes encontrados eran idénticos entre si y presentaban un tamaño aproximado de 1329 pb (Figura 12).

Para el caso de las especies de *Leishmania* del Viejo Mundo pertenecientes al subgénero *Leishmania*, se encontró que *L. (L.) infantum* y *L. (L.) major* poseen tres loci del gen de β -tubulina cada una en los cromosomas 8, 21 y 33 respectivamente. Este resultado coincide con lo reportado por Jackson (Jackson y col. 2006a); sin embargo, al compararse presentaron diferencias significativas entre si.

En *L. (L.) infantum*, el cromosoma 8 presentó dos copias del gen con un máximo de identidad del 96% con respecto al patrón de *L. (V.) guyanensis* y tres regiones *Hind*III mientras que en *L. (L.) major* solo se encontró una copia del gen con una máximo de identidad del 96% y solo un sitio de corte de la enzima hacia el extremo 5' (Figuras 13A y 13B). Es importante resaltar que en el caso de *L. (L.) infantum* el gen presenta en el nucleótido 755 una sustitución, con respecto a *L. (V.) guyanensis*, de una Timina (T) por una Adenina (A) lo cual genera un sitio de corte interno al gen mientras que en *L. (L.) major* dicho sitio no esta presente.

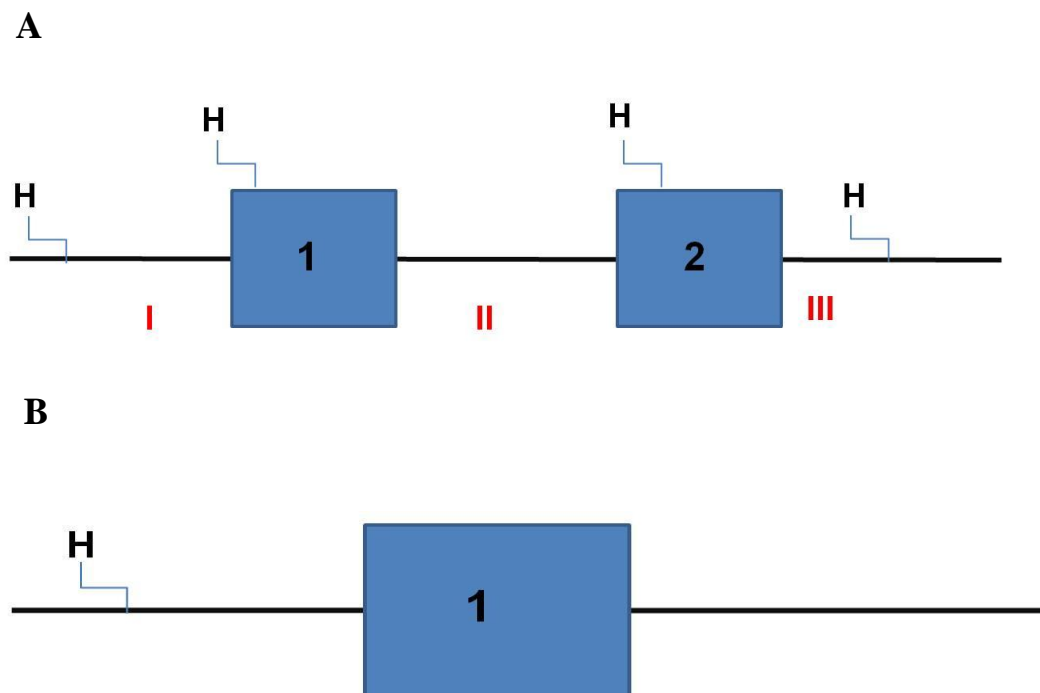


Figura 13.- Organización del gen de β -tubulina en el cromosoma 8 de *Leishmania (Leishmania) infantum* y *Leishmania (Leishmania) major*. **A: *L. infantum* 1: LinJ08.1170; 2: LinJ08.1180. **I:** fragmento de 40875 pb; **II** fragmento de 3548 pb; **III:** fragmento de 1047 pb. **B:** *L. major*: 1: LmjF08.1230.**

En el caso del cromosoma 21, si bien ambos presentaron solo una copia del gen con un máximo de identidad del 96% en *L. (L.) infantum* se halló nuevamente la sustitución anteriormente mencionada, lo cual provoca que existan dos fragmentos de digestión; mientras que para *L. (L.) major* no existe esta sustitución por lo que solo hay una región (Figuras 14A y 14B).

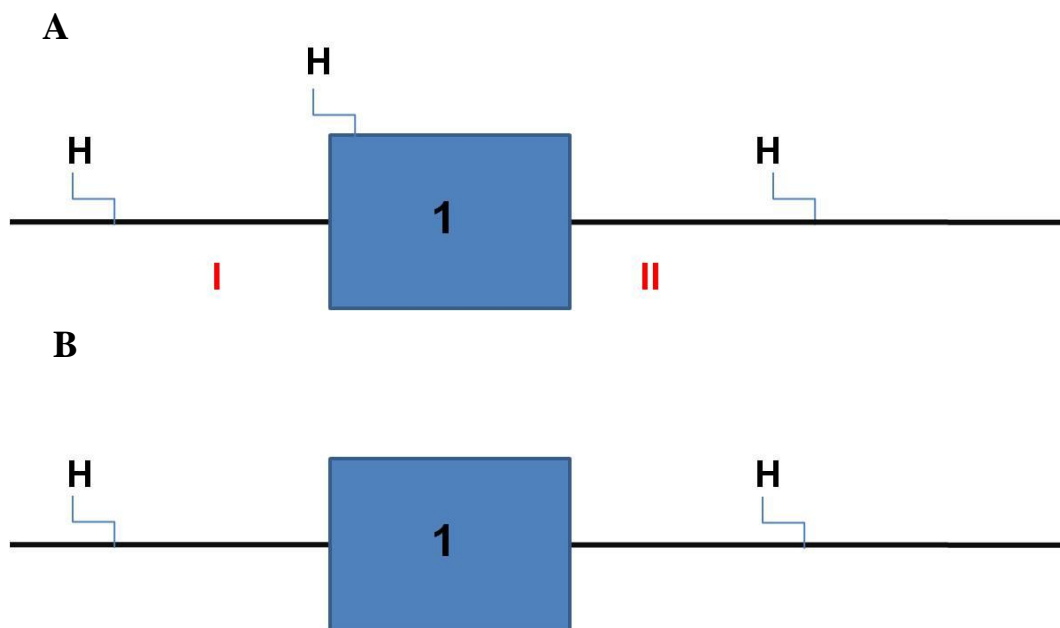


Figura 14.- Organización del gen de β -tubulina en el cromosoma 21 de *Leishmania (Leishmania) infantum* y *Leishmania (Leishmania) major*. A: *L. infantum* 1: LinJ21.1630. I: fragmento de 13618 pb; II fragmento de 7426 pb. B: *L. major* Se genera solo un fragmento de 48535 pb; 1: LmjF21.1860.

Las mayores diferencias se hallaron en el cromosoma 33 ya que *L. (L.) infantum* tiene una región de aproximadamente 5,1 kb con solo un locus (máximo de identidad del 96%) y sin sitios internos de reconocimientos para *Hind*III; en contraste con *L. (L.) major* donde se encontró una repetición en tándem de aproximadamente 16 genes con un máximo de identidad del 96%, iguales entre sí y con la sustitución del nucleótido 755 interno al gen que provocó la aparición de

fragmentos de aproximadamente 3,5 kb. En la figura 15 se muestran estos resultados.

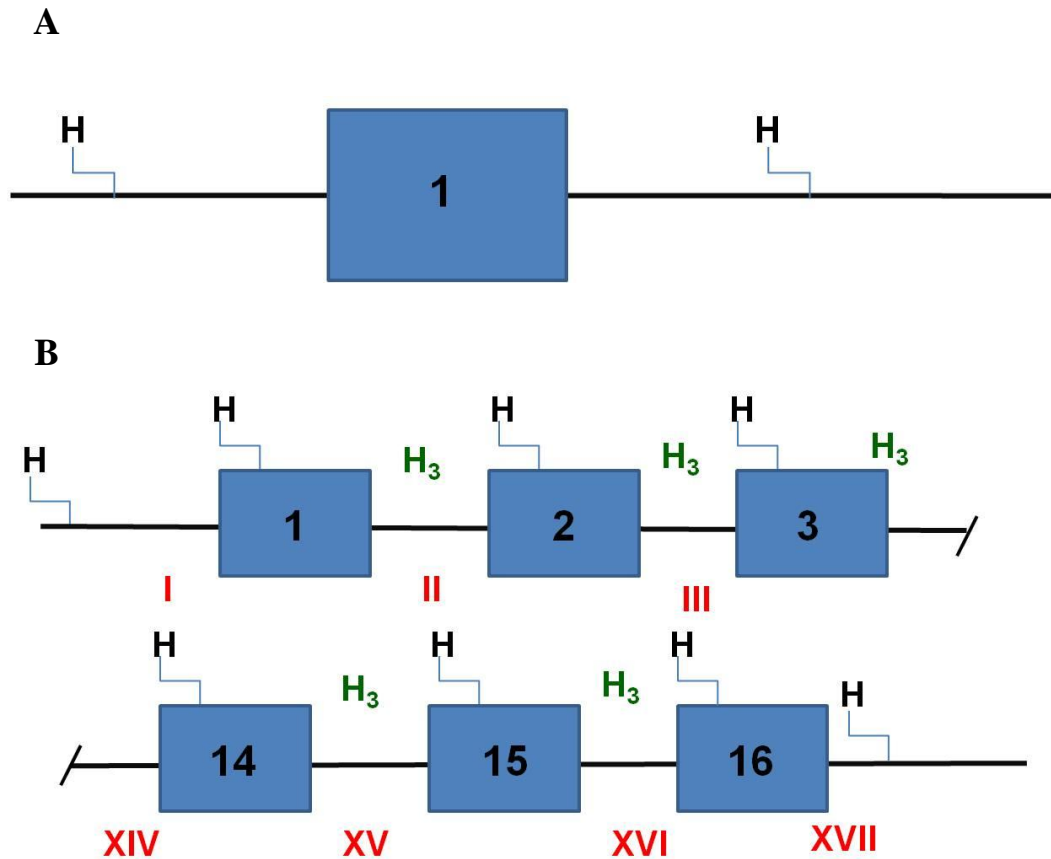


Figura 15.- Organización del gen de β -tubulina en el cromosoma 33 de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* y *Leishmania* (*Leishmania*) *major*. A: *L. (L.) infantum*. Solo se genera un fragmento de 5133 pb; 1: LinJ33.0830. B: *L. (L.) major* Se colocan solo los tres primeros y los tres últimos genes de la repetición en tándem y se muestra la ubicación de la región H₃. 1: LmjF33.0792; 2: LmjF33.0794; 3: LmjF33.0796; 14: LmjF33.0818; 15: LmjF33.0819; 16: LmjF33.0820. I: fragmento de 9618 pb; II-III y XIV-XVI: fragmentos de 3587 pb; XVII: fragmento de 658 pb.

En el caso de *L. (V.) braziliensis* se encontró que había solo dos loci para β -tubulina en los cromosomas 21 y 33. El locus ubicado en el cromosoma 21 presentó solo una copia del gen de β -tubulina con una coincidencia del 97% con

respecto a *L. (V.) guyanensis*; este gen también mostró la sustitución en el nucleótido 755 que genera el corte *Hind*III interno (Figura 16).

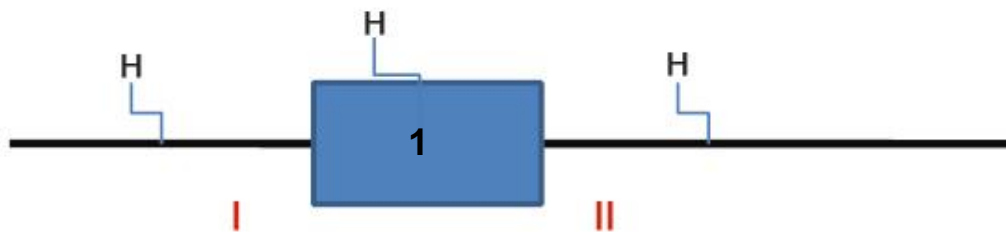


Figura 16.- Organización del gen de β -tubulina en el cromosoma 21 de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 1: LbrM21_V2.2150; I: fragmento de 27340 pb; II: fragmento de 9458pb.

Uno de los resultados más interesantes se encontró en el cromosoma 33 donde se localizó una repetición en tándem de aproximadamente 7 genes similar a la hallada en *L. (L.) major* pero a diferencia de esta, los genes que la constituyen son notablemente disimiles entre sí. El primero de ellos, identificado como LbrM33_V2.0920 presentó un 98% de homología con la secuencia patrón y la sustitución en el nucleótido 755, cambio que solo se repite en los genes LbrM33_V2.0930 y LbrM33_V2.0960. Analizando el tamaño en pares de bases se encontró que LbrM33_V2.0950, LbrM33_V2.0990 y LbrM33_V2.1010 presentaban un tamaño mucho menor al esperado, entre 500 y 600 pares de bases, lo cual puede indicar la presencia de pseudogenes; este fenómeno no se evidencia en ninguno de los loci analizados de *L. (L.) infatum* y *L. (L.) major*. Una vista más detallada de estos reveló que mientras LbrM33_V2.0950 y LbrM33_V2.1010 coinciden con la región terminal de la secuencia patrón con un 99%,

LbrM33_V2.0990 (que físicamente esta ubicada entre estos) tiene una correspondencia del 96 % con la región inicial del gen de β -tubulina.

Al realizar la digestión *in silico* con la enzima *Hind*III se halló en el arreglo la presencia de dos segmentos de aproximadamente 2,4 kb en cuyos extremos se encontraban secuencias de β -tubulina y en el centro la secuencia β -500 diagnóstica de la región H₁; no se halló ningún fragmento que correspondiese en tamaño a la región H₂. En la figura 17 se muestran estos resultados.

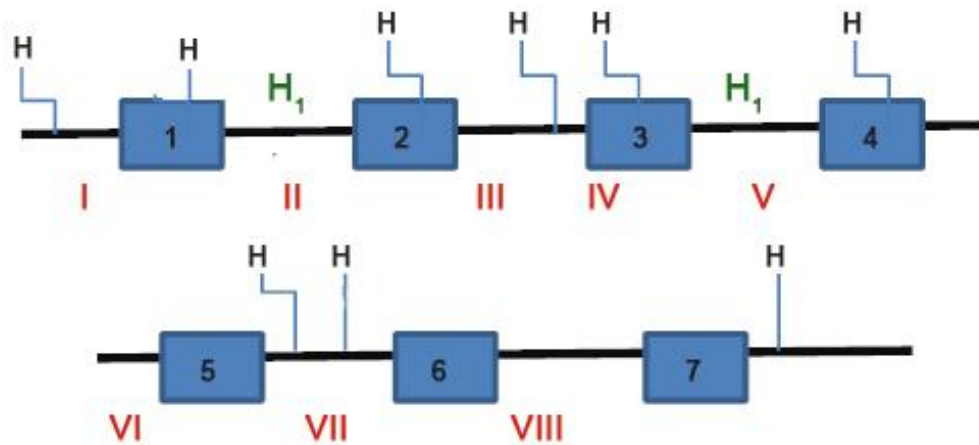


Figura 17.- Organización del gen de β -tubulina en el cromosoma 33 de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Los rectángulos simbolizan la ubicación de los genes; **1:** LbrM33_V2.0920; **2:** LbrM33_V2.0930; **3:** LbrM33_V2.0950; **4:** LbrM33_V2.0960; **5:** LbrM33_V2.0990; **6:** LbrM33_V2.1000; **7:** LbrM33_V2.1010; H muestra los puntos de corte con la enzima *Hind*III. **I:** fragmento de 5258 pb; **II** fragmento de 2348 pb; **III:** fragmento de 5420 pb; **IV:** fragmento 1364 pb; **V:** fragmento de 2344 pb; **VI:** fragmento de 16911 pb; **VII:** fragmento de 1221 pb; **VIII:** fragmento de 18521 pb. Se remarca la posición del fragmento H₁.

Tabla 8.- Resumen de los fragmentos HindIII encontrados en *Leishmania* sp. Se muestran los porcentajes de identidad con respecto a la secuencia blanco

Subgénero <i>Viviania</i>						
	# Copias Cromosoma 8	Fragmentos HindIII	# Copias Cromosoma 21	Fragmentos HindIII	# Copias Cromosoma 33	Fragmentos HindIII
<i>L. (V) braziliensis</i>						5258 pb 2348 pb 5240 pb 2344 pb 16911 pb 1221 pb 18521 pb
	Trabajo <i>in silico</i>	-	-	1	27340 pb 9458 pb	7
	Jackson y col, 2006	-	1	-	2	-
Subgénero <i>Leishmania</i>						
<i>L. (L.) infantum</i>		40875 pb				
	Trabajo <i>in silico</i>	2	3548 pb 1047 pb	1	13618 pb 7426 pb	1
	Jackson y col, 2006	1	-	1	-	2
<i>L. (L.) major</i>						9618 (1) 3587 pb (15) 658 pb (1)
	Trabajo <i>in silico</i>	1	-	1	48535 pb	16
	Jackson y col, 2006	1	-	1	-	2

CAPITULO IV

6.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los genes de la β -tubulina han demostrado poseer la suficiente variabilidad para diferenciar entre las especies de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo (Mendoza-León, 1991) y entre las especies del Nuevo Mundo los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. Trabajos previos han demostrado la existencia de tres regiones *Hind*III en el genoma de *Leishmania* que contienen la región codante del gen de β -tubulina: H₁ y H₂ presentes solo en el subgénero *Viannia* y H₃ presente solo en el subgénero *Leishmania* (Figura 3) (Mendoza-León, 1991). El estudio detallado de H₁ y H₃ ha llevado al desarrollo de secuencias específicas para los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*, β 500 y L280 respectivamente que sirven de blanco para ensayos de PCR (Luis y col, 2001; Orue y col, 2008); sin embargo ensayos de hibridación β 500-H₂ han demostrado que en esta región no está presente β 500, sugiriendo la presencia de otra secuencia con potencial para el desarrollo de un nuevo marcador molecular subgénero-específico (Figura 4).

Para llevar a cabo la evaluación de esta región, previamente se realizó un clonamiento de la misma en pUC19 en células de *E. coli*; y como resultado se obtuvieron tres clones que coinciden tanto en tamaño como en la presencia del gen de tubulina con la región H₂ (Cuervo, 2008). Este estudio partió de uno de esos clones denominado 8B, pero debido a problemas de manejo de la librería que conllevaron a la contaminación y posterior pérdida de la misma se decidió realizar de nuevo todo el proceso de clonamiento (Cuervo, 2008).

En este proceso se utilizó el DNAG de la cepa de *L. (V.) panamensis* UA140 y tras un proceso de extracción y purificación se obtuvo un pool de fragmentos de aproximadamente 3000 pb. Es importante acotar que en los pasos claves, se mantuvo un monitoreo de la presencia del gen de tubulina mediante un ensayo de PCR Tub₁/Tub₆: antes de iniciar la digestión con *Hind*III y después de la digestión y luego de realizar la purificación del gel. Esto se hizo para asegurar que el gen no era degradado durante el proceso de purificación lo cual hubiese hecho imposible la identificación posterior; y por otro lado se aseguraba que entre el pool de fragmentos se encontraba la región de interés. A pesar del éxito del clonamiento, la evaluación de los clones obtenidos no demostró la presencia de β -tubulina en ninguno de ellos. Estando en conocimiento de la multiplicidad de los genes de β -tubulina, una explicación de estos resultados estaría relacionada con la baja concentración del pool de DNA inicial, ya que la concentración de H₂ necesaria para el proceso de ligamiento depende de dicho pool. Sin embargo el análisis *in silico*, al igual que los trabajos de Jackson y col (2006a) sugieren que probablemente en esta región hay un gen único para β -tubulina, de lo cual puede inferirse que el número de clones estudiados fue menor que el necesario para detectar una secuencia única.

Paralelo al clonamiento, se realizó una evaluación *in silico* de las regiones *Hind*III que contenían los genes de β -tubulina en varias especies de *Leishmania* utilizando como comparación la organización de estos genes en *Trypanosoma brucei*. Los resultados encontrados con nuestro estudio para *T. brucei* coinciden con el trabajo *in silico* de Jackson y col (2006b) y los resultados experimentales

de Seebeck y col (1983) en relación a un arreglo en el que se alternan los genes de α -tubulina y β -tubulina y que esta ubicado en el cromosoma 1, donde se generan fragmentos *Hind*III de aproximadamente 3,6 kb.

Al comparar la ubicación de β -tubulina en el género *Leishmania*, se observa que a diferencia de *T. brucei*, el cual solo tiene un solo locus en el cromosoma 1, *Leishmania* posee varios loci distribuidos en distintos cromosomas formando arreglos en tándem o copias únicas. En el caso de *L. (L.) infantum*, se encontraron 3 loci: una repetición de dos genes en el cromosoma 8 y copias únicas en los cromosomas 21 y 33 (Tabla 8) resultados ligeramente distintos a los reportados por Jackson y col (2006a).

Una de las diferencias más resaltantes es el hallazgo de dos copias del gen en el cromosoma 8 de *L. (L.) infantum* mientras que Jackson y col. (2006a) reportan solo una copia. Otra diferencia que se encuentra es la presencia en *L. (L.) infantum* de una copia única denominada LinJ33.0830 sobre el cromosoma 33, en contraste con lo propuesto por Jackson y colaboradores (2006a) que mencionan dos copias sobre este cromosoma en la misma especie.

La evaluación *in silico* de los sitios *Hind*III sobre las copias del cromosoma 8 (LinJ08.1170 y LinJ08.1180) y 21 (LinJ21.1630) mostró un sitio de corte para la enzima *Hind*III en el nucleótido 755 el cual esta ausente en LinJ33.0830. Según lo hallado en el trabajo de Mendoza-León (1991) no se encuentran sitios de cortes internos al gen para esta enzima en el subgénero *Leishmania*, ya que de lo contrario por hibridación se evidenciarían más de una

banda y esto no fue lo encontrado en el subgénero *Leishmania* donde solo se evidenció la región H₃. Esto sugiere que la presencia de este sitio *HindIII* en *L. (L.) infantum* puede provenir de un error en la secuenciación. Esta idea es apoyada por el hecho de que si bien se encontró un fragmento de aproximadamente 3,4 kb en el cromosoma 21 que en principio coincide con el tamaño esperado para H₃.

Cuando se comparan estos resultados con los obtenidos en *L. (L.) major*, se observan diferencias considerables entre los dos, comenzando por el hecho de que en los cromosomas 8 y 21 solo hay copias únicas que no poseen el sitio *HindIII* en concordancia con trabajos anteriores (Mendoza-León, 1991). En este organismo la repetición en tándem se encuentra en el cromosoma 33, donde existen al menos 16 genes idénticos en oposición a lo reportado por Jackson y col (2006a) en el cual solo se presenta un arreglo de 2 genes. Una evaluación mas detallada de este cromosoma reveló que los fragmentos coinciden con la región H₃ ya que ambas poseen un tamaño similar.

Contrastando la ubicación de estos loci con los presentes en *L. (V.) braziliensis* se encuentran diferencias considerables, ya que en este organismo solo aparecen dos loci: uno en el cromosoma 21 y un tándem en el cromosoma 33 resultados que tienen un apoyo experimental tanto en los resultados de Mendoza-León (1991) como en lo desarrollado en el presente trabajo pero que están en oposición con los de Jackson y col (2006a y b) ya que estos autores mencionan la presencia de un tercer locus.

Según el trabajo publicado por Jackson (2006) el cromosoma 8 posee una copia única del gen de β -tubulina, pero la búsqueda general según los parámetros anteriores no arrojó coincidencia. Tomando esto en cuenta, se procedió a hacer una comparación entre la secuencia completa del cromosoma 8 y el patrón de *L. (V.) guyanensis* encontrándose que ambas solo coincidían en menos de 40 nucleótidos. Para descartar posibles errores de la búsqueda se utilizó la herramienta Map Viewer, disponible en el sitio web del NCBI, que permite visualizar todos los cromosomas de un organismo y los genes que allí se encuentran; además se puede hacer la búsqueda de un gen particular dentro del cromosoma de interés. El resultado obtenido mostró que efectivamente el gen LbrM08_V2.1040 (número de acceso XM_001562110) estaba identificado como β -tubulina, pero al realizar un alineamiento contra la secuencia patrón ambos genes eran totalmente diferentes.

En el cromosoma 33 se encontraron dos fragmentos de aproximadamente 2,4 kb que contienen la secuencia β 500 (diagnóstica de la región H₁) pero una evaluación posterior arrojó que los genes de β -tubulina que se encuentran en este fragmento contienen un sitio *Hind*III interno, resultado que no coincide con lo reportado por Luis (1997); es decir que si bien este coincide con H₁ en tamaño y presencia de β 500, el sitio *Hind*III no concuerda con lo encontrado experimentalmente. Esta diferencia entre este fragmento de 2.4 Kb y H₁ junto con la ausencia de un fragmento de 3 kb en *L. (V.) braziliensis* puede ser explicadas nuevamente por errores en la secuenciación ya que todos los resultados expuestos anteriormente en este proyecto durante el proceso de clonamiento como los

análisis *in silico* así como trabajos anteriores (Mendoza-León, 1991; Luis y col, 1997; Cuervo, 2008) validan la existencia de un fragmento *HindIII* en el subgénero *Viannia* de aproximadamente 3 kb que contiene la región codante del gen de β -tubulina.

7.- CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos durante la purificación del fragmento y en la evaluación *in silico* apoyan la existencia de una región de 3 kb (H₂) que contiene el gen de β -tubulina.
- La evaluación *in silico* arrojó que *Leishmania (Viannia) braziliensis* solo posee dos loci para β -tubulina localizadas en los cromosomas 21 y 33 en lugar de tres como lo reportado por Jackson y col (2006a).
- Se demostró la presencia de una región de 2,4 kb que presentó la secuencia β 500 pero que mostro diferencias con la región H₁ en el genoma de *Leishmania (Viannia) braziliensis* mediante un análisis *in silico*.
- El análisis *in silico* de las regiones de β -tubulina en *Leishmania (Leishmania) infantum* no reveló la presencia de un fragmento que coincida con la region H₃.
- La evaluación *in silico* de las regiones de β -tubulina en *Leishmania (Leishmania) major* reveló la presencia de un fragmento que coincide con la región H₃ en términos de tamaño.

8.- RECOMENDACIONES

Se recomienda llevar a cabo el procedimiento de clonamiento aumentando las cantidades de DNA para asegurar que la región H₂ sea lo suficientemente abundante y no se pierda durante los procedimientos posteriores. Además es aconsejable llevar a cabo distintos ensayos de PCR combinando los oligonucleótidos Tub₁/Tub₆ y Forward/Reverse, estos últimos presentes en el vector para completar la caracterización.

Tabla 9.- Combinaciones de oligonucleótidos propuesta para la caracterización de la región H₂.

Ensayo	Oligonucleótidos
1	Tub ₁ /Forward
2	Tub ₁ /Reverse
3	Tub ₆ /Forward
4	Tub ₆ /Reverse

CAPITULO V

9.- BIBLIOGRAFÍA

Alvarez, A., Nodarse, J., Goodridge, I., Fidalgo, L., Marin, M., Van Der Auwerac, G., Dujardin, J., Bernal, I., Muskus, C. 2009. Differentiation of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* using *BccI* for *hsp70* PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **104**: 364–367.

Anderson, D., Keith, J., Novak, P., Elliot, M. 2005. Diccionario Mosby de Medicina, Enfermería y Ciencias de la Salud. Elsevier, Sexta edición, España.

Barrio, A., Mora, M., Ramos, F., Moreno, S., Samson, R., Basombrío, M. 2007. Short Report: use of kDNA-based Polymerase Chain Reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of american tegumentary leishmaniasis in disease-endemic areas of northern Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77(4)**: 636-639.

Bari, A., Rahman, S. 2008. Cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship. *J Pak Assoc Dermatol.* **18**: 42-48.

Cupolillo, E., Brahim, L., Toaldo, C., Oliveira-Neto, M., de Brito, M., Falqueto, A., Naiff, M., Grimaldi, G. Jr. 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **41(7)**: 3126-3132.

Castilho, T., Shaw, J., Winter-Floeter, L. 2003. New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of *Leishmania* Species. *J Clin Microbiol.* **41(2)**: 540-546.

Chappuis, F., Rijal, S., Soto, A., Menten, J., Boelaert, M. 2006. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ.* **333**: 723-726.

Cuervo, A. 2008. Variabilidad de β -tubulina en *Leishmania (Viannia)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Dass, S., Adhya, S. 1990. Organization and chromosomal localization of β -tubulin genes in *Leishmania donovani*. *J. Biosci.* **15(4)**: 239-248.

De Lima, H., Rodríguez, N., Barrios, M., Ávila, A., Cañizales, I., Gutiérrez, S. 2008. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **103(4)**: 412-414.

Faber, W., Hay, R., Naafs, B. 2007. Imported Skin Diseases. Reed Business, Primera Edición, Holanda.

Foulet, F., Botterel, F., Buffet, P., Morizot, G., Rivollet, D., Deniau, M., Pratlong, F., Costa, J., Bretagne, S. 2007. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the Cytochrome b gene. *J Clin Microbiol.* **45(7)**: 2110–2115.

- García, H.; Mendoza-León, A. 2000. Diagnóstico molecular en protozoarios Kinetoplastida. Principios y Aplicaciones. *Rev. Fac. Cs. Vets UCV*. **41**: 109-130.
- Giannini, S., Schittini, M., Keithly, JS., Warburton, PW., Cantor, CR., Van der Ploeg, LH. 1986. Karyotype analysis of *Leishmania* species and its use in classification and clinical diagnosis. *Science*. **232**: 762-765.
- Grimaldi, G. Jr., David, J., McMahon-Pratt, D. 1987. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg*. **36**: 270-287.
- Grimaldi, G., Tesh, R. 1993. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clin Microbiol Rev*. **6(3)**: 230-250.
- Hatam, G., Rezanezhad, H., Motazedian, M., Sarkari, B. 2009. *in vitro* infectivity of *Leishmania major* isolated from patients with different clinical forms of cutaneous leishmaniasis and its association with parasite zymodemes. *Iranian J Parasitol*. **4(3)**: 52-60.
- Henk, D., Schallig, F., Oskam, L. 2002. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health*. **7(8)**: 641-651.
- Howard, M., Kelly, J., Lane, R., Miles, M. 1990. A sensitive repetitive DNA probe that is specific to the *Leishmania donovani* complex and its use as an epidemiological and diagnostic reagent. *Mol Biochem Parasitol*. **44**: 63-72.

Huang, P., Roberts, B., Pratt, D., David, J., Miller, J. 1984. Structure and Arrangement of the β -Tubulin Genes of *Leishmania tropica*. *Mol Cell Biol.* **4(7)**:1372-1383.

Ivens, A., Peacock, C., Worthey, E., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science.* **309(5733)**: 436–442.

Jackson, A., Vaughan, S., Gull, K., 2006a. Comparative genomics and concerted evolution of β -tubulin paralogs in *Leishmania* spp. *BMC Genomics.* **7**: 137.

Jackson, A., Vaughan, S., Gull, K., 2006b. Evolution of tubulin gene arrays in Tripanosomatid parasites: genomic restructuring in *Leishmania*. *BMC Genomics.* **7**: 261.

Lainson, R; Shaw, J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. En: Peters, W., Killick-Kendric, R. (Eds). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol. I. Biology and Epidemiology. Academic Press. Primera Edicion. pp 1-120.

Landfear, S., Pratt D., Wirth, D. 1983. Tandem Arrangement of Tubulin Genes in the Protozoan parasite *Leishmania enriettii*. *Mol Cell Biol.* **3(6)**: 1070-1076.

Luis, L. 1997. pLg β 500: una secuencia especifica del subgénero *Viannia*. Trabajo de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Luis, L., Ramírez, A., Aguilar, C., Eresh, S., Barker, D., Mendoza-León A. 1998. The genomic fingerprinting of the coding region of the beta-tubulin gene in *Leishmania* identification. *Acta Trop.* **69(3)**:193-204.

Luis L. Ramírez, A., Ramírez, R., Vélez, I., Mendoza-León, A. 2001. Nuclear DNA sequence specific to *Leishmania* (*Viannia*) subgenus: a molecular marker for species identification. *Parásitology.* **122**: 404-414.

Mendoza-León, A. 1991. Analysis of DNA sequence similarity within organisms causing New World Leishmaniasis. Tesis Doctoral. Universidad de Cambridge. Reino Unido

Mendoza-León A., Havercroft J., Barker D. 1995. The RFLP analysis of the beta-tubulin gene region in New World *Leishmania*. *Parásitology.* **111** (1):1-9.

Mendoza-León, A., Shaw, J., Tapia, F. 1996. A guide for the cutaneous Leishmaniasis connoisseur. En: Tapia, J., Dittmar, G., Sánchez, M. (Eds). Molecular and immune Mechanism in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. R.G. Landes Company. pp 1-23.

Mendoza-León, A., Luis, L., Fernandes, O., Cupolillo, E., García, L. 2002. Molecular markers for species identification in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **96(1)**:65-70.

Navin, T., Arana, F., de Mérida, A., Arana B., Castillo, L., Silvers, D. 1990. Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg.* **42**:36-42.

Nieves, M., Díaz, E., Romero, A. 2007. Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio-resistencia en *Leishmania*. Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. 33.

Ovelle, C., Porras, L., Rey, M., Ríos, M., Camargo, Y. 2006. Distribucion geográfica de especies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E. S. E., 1995-2005. *Biomedica*. **26(1)**: 145-151.

Orué, A., de Abreua, N., Martínez, C., Mendoza-León, A. 2008. Identificación de una secuencia de DNA genómico de *Leishmania* específica del subgénero *Leishmania*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. **28**: 6-13.

Oshaghi, M., Ravasan, N., Hide, M., Javadian, E., Rassi, Y., Sedaghat M., Mohebbali, M., Hajjaran, H. 2009. Development of species-specific PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism assays for *L. infantum*/*L. donovani* discrimination. *Exp Parasitol*. **122**: 61-65.

Peacock, C., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J., Quail, M., Peters, N. 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*. **39 (7)**: 839-847.

Reithinger, R., Dujardin, J. 2007. Molecular diagnosis of Leishmaniasis; current status and future applications. *J Clin Microbiol*. **45(1)**: 21-25.

Requena, J., Folgueira¹, C., López, M., Thomas, C. 2008. The SIDER2 elements, interspersed repeated sequences that populate the *Leishmania* genomes, constitute

subfamilies showing chromosomal proximity relationship. *BMC Genomics*. **9** (263)

Rotureau, B., Ravel, C., Couppie, P., Pratlong, F., Nacher, M., Dedet, J., Carne, B. 2006. Use of PCR-restriction fragments length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *J Clin Microbiol*. **44** (2): 459-467.

Sarkari, B., Chance, M., Hommel, M., 2005. A capture ELISA for the diagnosis of visceral leishmaniasis using a monoclonal antibody against leishmanial urinary antigen.

Scalone, A., De Lunab, R., Olivab, G., Baldi, L., Satta, G., Vesco, G., Mignonef, W., Turilli, C., Mondesire, R., Simpson, D., Donoghueh, A., Frank, G., Gradoni, L. 2002. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol*. **104**: 275–285.

Seebeck, T., Whittaker, P., Imboden, M., Hardman, N., Braun, R. 1983. Tubulin genes of *Trypanosoma brucei*: a tightly clustered family of alternating genes. *Biochemistry*. **80**: 4634-4638.

Seridi, N., Belkaidb, M., Quispe-Tintayac, W., Zidaned, C. Dujardin, J. 2008. Application of PCR-RFLP for the exploration of the molecular diversity of *Leishmania infantum* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. **102**: 556-563.

Spithill, T; Samaras, N. 1985. The molecular karyotype of *Leishmania major* and mapping of α and β -tubulin gene families to multiple unlinked chromosomal loci. *Nucleic Acids Res.* **13(11)**: 4155-4169.

Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. Second Edition.

Traub R., Monis P., Robertson I. 2005. Review Molecular epidemiology: A multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. *Int J Parasitol.* **35**:1295-1307.

Van der Meide, W., Guerra, J., Schoone, G., Farenhorst, M., Coelho, L. 2008. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* Parasites. *J Clin Microbiol.* **46 (1)**: 73-78.

Weigle, K., Labrada, L., Lozano, C., Santrich, C., Barker, D. 2002. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *J Clin Microbiol.* **40(2)**: 601-606.

10.- REFERENCIAS EN INTERNET

Academia Bioquímica Digital. Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio-resistencia en *Leishmania*. 2007. (Consultado el 06 de Octubre de 2008). Disponible en: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=39&m=2&n=1165&e=1214>.

National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Leishmaniasis y sus vectores. Torrealba, J. 2008. (Consultado 29 de Septiembre de 2009)

Disponible en: <http://biosalud.saber.ula.ve/db/ssalud/edocs/articulos/Leishmaniasis.pdf>

Organización Mundial de la salud. Leishmaniasis: Actualización 2007 (En línea).

2007 (Consultado el 08 de Octubre de 2008) Disponible en:

<http://www.who.int/en/>

11.- ANEXOS

Anexo 1

Números de acceso de las secuencias utilizadas para el análisis *in silico*

Organismo	Secuencia	Número de Acceso NCBI
<i>Trypanosoma brucei</i>	Secuencia completa Cromosoma 1	AL929603
	Tb927.1.2330	XM_001218932
	Tb927.1.2350	XM_001218934
	Tb927.1.2370	XM_001218936
	Tb927.1.2390	XM_001218938
<i>Leishmania guyanensis</i>	Region codante del gen de β -tubulina	DQ836297
<i>Leishmania braziliensis</i>	Secuencia completa Cromosoma 33	NC_009325
	LbrM33_V2.0920	XM_001567812
	LbrM33_V2.0930	XM_001567813
	LbrM33_V2.0950	XM_001567815
	LbrM33_V2.0960	XM_001567816
	LbrM33_V2.0990	XM_001567819
	LbrM33_V2.1010	XM_001567820
	Secuencia completa Cromosoma 21	NC_009313
	LbrM21_V2.2150	XM_001564866
<i>Leishmania infantum</i>	Secuencia completa Cromosoma 8	AM502226
	LinJ08.1170	XM_001463414
	LinJ08.1180	XM_001463415
	Secuencia completa Cromosoma 21	NC_009405

	LinJ21.1630	XM_001465447
	Secuencia completa Cromosoma 33	AM502251
	LinJ33.0830	XM_001463414
<i>Leishmania major</i>	Secuencia completa Cromosoma 8	NC_007249
	LmjF08.1230	XM_001681104
	Secuencia completa Cromosoma 21	NC_007262
<i>Leishmania major</i>	LmjF21.1860	XM_001683100
	Secuencia completa Cromosoma 33	NC_007285
	LmjF33.0792	XM_001685771
	LmjF33.0794	XM_001685772
	LmjF33.0796	XM_001685773
	LmjF33.0798	XM_001685774
	LmjF33.0800	XM_001685775
	LmjF33.0802	XM_001685776
	LmjF33.0804	XM_001685777
	LmjF33.0806	XM_001685778
	LmjF33.0808	XM_001685779
	LmjF33.0810	XM_001685780
	LmjF33.0812	XM_001685781
	LmjF33.0814	XM_001685782
	LmjF33.0816	XM_001685783
	LmjF33.0818	XM_001685784
	LmjF33.0819	XM_001685785
	LmjF33.0820	XM_001685786